



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SEXO-ESPECÍFICOS DE TILÁPIA-
DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) UTILIZANDO GERMOPLASMA
BRASILEIRO**

KÁIFER JOSÉ SOARES SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF

DEZEMBRO DE 2024



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SEXO-ESPECÍFICOS DE TILÁPIA-
DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) UTILIZANDO GERMOPLASMA
BRASILEIRO**

KÁIFER JOSÉ SOARES SILVA

ORIENTADOR: Dr. ALEXANDRE RODRIGUES CAETANO

COORIENTADORA: Dra. PATRÍCIA IANELLA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO:

BRASÍLIA/DF

DEZEMBRO DE 2024

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SILVA, K. J. S. Identificação de Marcadores Sexo-Específicos de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) Utilizando Germoplasma Brasileiro. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2024, 74 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, Káifer José Soares. Identificação de Marcadores Sexo-Específicos de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) Utilizando Germoplasma Brasileiro. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2024. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2024.

1. Discordância entre genótipo e fenótipo.
2. GWAS.
3. Marcadores moleculares.
4. Psicultura.
5. Tilapicultura.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SEXO-ESPECÍFICOS DE TILÁPIA-
DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) UTILIZANDO GERMOPLASMA
BRASILEIRO**

KÁIFER JOSÉ SOARES SILVA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**ALEXANDRE RODRIGUES CAETANO, Doutor (Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia) (ORIENTADOR)**

**PATRÍCIA IANELLA, Doutora (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)
(COORIENTADORA)**

**CONCEPTA MARGARET MCMANUS PIMENTEL, Doutora (Universidade de
Brasília) (EXAMINADORA INTERNA)**

**LARISSA PAOLA RODRIGUES VENANCIO, Doutora (Universidade Federal do
Oeste da Bahia) (EXAMINADORA EXTERNA)**

**KARINA DE CASSIA FARIA, Doutora (Universidade do Estado de Mato Grosso)
(EXAMINADORA SUPLENTE)**

BRASÍLIA/DF, 09 DE DEZEMBRO DE 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à força maior que rege o universo e que constantemente me protege e ilumina, permitindo-me seguir em minha trajetória.

Minha profunda gratidão à minha família, especialmente aos meus pais, Aparecida e José Wilson, que me ofereceram todo o apoio, acolhimento e oportunidades de aprendizado, renunciando a seus próprios sonhos para que eu pudesse seguir os meus. À minha irmã, Ludmila, que considero uma segunda mãe e que foi essencial para que eu chegasse até aqui. Ao meu irmão, Wisner, meu grande companheiro, que sempre me ajudou e acolheu.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado, que me ouviram, compreenderam e apoiaram, mesmo diante da minha pouca disponibilidade e presença. Em especial, às minhas queridas amigas Carla Roberta, Fernanda Moura, Helena Santos e Maiara Nogueira, que considero como irmãs. À minha grande amiga e colega de mestrado, Aline Campelo, que me apoiou não apenas durante o mestrado, mas em diversas outras ocasiões. Agradeço também à minha amiga e colega da Embrapa, Nayelle Meyre, que me ensinou inúmeras análises e sanou todas minhas dúvidas, sendo imprescindível para a minha pesquisa. A todos os amigos e colegas da Embrapa que me proporcionaram bons momentos e um ambiente agradável.

Aos meus orientadores, Dr. Alexandre Caetano e Dra. Patrícia Ianella, minha profunda gratidão por todos os ensinamentos, paciência, compreensão e dedicação que me permitiram concluir este trabalho. Graças a vocês, pude crescer e evoluir ao longo desta jornada.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a. Dra. Connie, Prof^a. Dra. Larissa e Prof^a. Dra. Karina, meus sinceros agradecimentos por terem aceitado contribuir com seus conhecimentos para esta dissertação.

Agradeço também à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo fornecimento da infraestrutura e apoio profissional essenciais à realização desta pesquisa, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da Universidade de Brasília, pela oportunidade da realização do Mestrado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro que possibilitou a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	2
1.2 OBJETIVOS.....	6
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
1.3.1. Aspectos gerais da tilápia-do-Nilo.....	7
1.3.2. Linhagem GIFT.....	10
1.3.3. Produção mundial e brasileira de tilápia-do-Nilo.....	13
1.3.4. Determinação de sexo, reversão sexual e populações monosexo de machos.....	18
1.3.4.1. Determinação do sexo em peixes.....	18
1.3.4.2. Reversão sexual.....	21
1.3.4.3. Populações monosexo.....	22
1.3.5. Sexagem molecular e incompatibilidades na identificação do sexo.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
 CHAPTER 2.....	 39
IDENTIFICATION OF SEX-SPECIFIC MARKERS IN NILE TILAPIA	
(<i>Oreochromis niloticus</i>) USING GERMPLASM AVAILABLE IN BRAZIL.....	39
2.1. RESUMO.....	40
2.2. ABSTRACT.....	42
2.3. INTRODUCTION.....	44
2.4. MATERIAL AND METHODS.....	45
2.4.1. Fish sampling.....	45
2.4.2. DNA extraction.....	46

2.4.3. Molecular sexing of samples.....	47
2.4.4. Sample selection.....	48
2.4.5. Sample sequencing and identification of variant positions.....	49
2.4.6. SNP data quality control.....	49
2.4.7. Genome-wide association studies (GWAS)	49
2.5. RESULTS.....	51
2.5.1. Molecular sexing assays and selected samples.....	51
2.5.3. Genome-wide association study.....	52
2.6. DISCUSSION.....	56
REFERENCES.....	60
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	68
CAPÍTULO 3.....	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
3.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SEXO-ESPECÍFICOS DE TILÁPIA- DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) UTILIZANDO GERMOPLASMA BRASILEIRO

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a segunda espécie mais importante para a aquacultura global e possui grande relevância econômica no Brasil. Em 2022, a espécie representou 55,3% da produção aquícola nacional. A linhagem GIFT, criada a partir do cruzamento de diferentes populações, é a mais cultivada em território nacional. Uma vez que os machos apresentam crescimento superior ao das fêmeas, populações monossexo são comumente geradas a partir de tratamento hormonal, em processos que apresentam riscos ambientais. Populações monossexo de machos também podem ser obtidas com o uso de supermachos (YY) em acasalamentos com fêmeas normais (XX). No entanto, essa técnica exige marcadores moleculares 100% precisos para a determinação confiável do sexo. O objetivo deste estudo foi analisar amostras da linhagem GIFT mantidas no Brasil em um estudo de associação genômica ampla (GWAS - *Genome-Wide Association Study*) para a identificação de marcadores moleculares associados ao sexo. O marcador Amh_EVII foi utilizado para realizar genotipagem por PCR de amostras sexadas com o objetivo de fazer uma pré-seleção de indivíduos para serem genotipados por GBS. Após a genotipagem, os indivíduos foram organizados em quatro categorias, considerando a concordância ou discordância entre os sexos fenotípico e molecular. No total, seis análises de GWAS para comparações entre grupos foram realizadas: (1) machos e fêmeas com concordância entre sexo fenotípico e genotípico; (2) machos e fêmeas com discordância entre sexo fenotípico e genotípico; (3) machos concordantes comparados com machos discordantes; (4) fêmeas concordantes comparadas com fêmeas discordantes; (5) machos concordantes comparados com fêmeas discordantes; e (6) fêmeas concordantes comparadas com machos discordantes. Os resultados confirmaram a presença do locus determinante do sexo (SDL) no grupo de ligação 23 (LG23), corroborando estudos anteriores sobre a linhagem GIFT. Além disso, foram identificados marcadores no LG5 com associação menos significativa à determinação sexual, cuja relevância requer investigação adicional. No LG23, 17 marcadores mostraram uma associação robusta com a determinação sexual, reforçando sua importância nesse processo.

PALAVRAS-CHAVE: aquacultura, reversão sexual, SNPs, supermachos.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF SEX-SPECIFIC MARKERS IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) USING GERMPLASM AVAILABLE IN BRAZIL

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the second most important species for global aquaculture and holds significant economic relevance in Brazil. In 2022, the species accounted for 55.3% of national aquaculture production. The GIFT strain, developed through the crossbreeding of different populations, is the most widely cultivated in the country. Since males exhibit superior growth compared to females, monosex populations are commonly produced through hormonal treatment, a process that poses environmental risks. Male monosex populations can also be achieved by mating supermales (YY) with normal females (XX). However, this technique requires highly precise molecular markers for reliable sex determination. The objective of this study was to analyze GIFT strain samples maintained in Brazil using a genome-wide association study (GWAS) to identify sex-associated molecular markers. The Amh_EVII marker was used for PCR-based genotyping of sexed samples to pre-select individuals for genotyping by GBS. After genotyping, individuals were categorized into four groups based on the concordance or discordance between phenotypic and molecular sex. A total of six GWAS comparisons were performed: (1) males and females with concordant phenotypic and genotypic sex; (2) males and females with discordant phenotypic and genotypic sex; (3) concordant males versus discordant males; (4) concordant females versus discordant females; (5) concordant males versus discordant females; and (6) concordant females versus discordant males. The results confirmed the presence of the sex-determining locus (SDL) on linkage group 23 (LG23), in agreement with previous studies on the GIFT strain. Additionally, markers on LG5 were identified with a less significant association with sex determination, warranting further investigation. On LG23, 17 markers showed a strong association with sex determination, reinforcing their critical role in this process.

KEYWORDS: aquaculture, sex reversal, SNPs, supermales.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um ciclídeo de água doce originário do continente africano e do Oriente Médio (TREWAVAS, 1983). É o segundo grupo de peixes mais produzido na aquacultura mundial, atrás apenas das carpas (FAO, 2024b). Atualmente, a tilápia é reconhecida como o principal produto da aquacultura do Brasil. Sua produção aquícola aumentou de 155,451 toneladas (t) em 2010 para 408,350 t em 2022, representando 66,15% da produção de piscicultura no país e 55,3% da produção total de aquacultura em 2022 (EMBRAPA, 2023; FAO, 2024b).

Tem-se observado um aumento anual da demanda por produtos da aquacultura tanto no mercado interno quanto internacionalmente (PEIXE BR, 2024; FAO, 2024b). A produção de tilápia tem sido muito importante para o desenvolvimento da aquacultura nacional (BARROSO *et al.*, 2019). O Brasil já é o quarto maior produtor de tilápia em cativeiro no mundo, ficando atrás somente da China (1,288,947 t), Indonésia (1,249,220 t) e Egito (964,196 t) (FAO, 2024b) e, se considerarmos as condições climáticas favoráveis e a abundante disponibilidade de recursos hídricos do país, é possível afirmar que a tilapicultura brasileira possui grande potencial para impactar positivamente a oferta de alimentos em escala global (SIQUEIRA, 2018; POUNDS *et al.*, 2022; TACON; METIAN, 2013; BARROSO *et al.*, 2019).

Uma das linhagens comerciais de tilápia presentes no Brasil, conhecida como GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*) tem sua origem em um projeto iniciado em 1988 pelo WorldFish Center, organização de pesquisa internacional sem fins lucrativos da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), e parceiros (GUPTA; ACOSTA, 2004; ADB, 2005). A linhagem GIFT foi criada a partir da combinação de quatro linhagens comerciais asiáticas de tilápia cultivadas – Israel, Taiwan, Singapura e Tailândia – e mais quatro linhagens silvestres de origem africana – Egito, Gana, Quênia e Senegal (GUPTA; ACOSTA, 2004), com o objetivo de maximizar a variabilidade genética da população base utilizada na criação e aprimoramento da tilápia GIFT (GUPTA; ACOSTA, 2004; ADB, 2005). No Brasil, as primeiras famílias dessa linhagem foram introduzidas em 2005 e, desde então, esse material genético tem sido amplamente difundido e utilizado nas pisciculturas comerciais (LUPCHINSKI JÚNIOR *et al.*, 2008). Tal fato se deve às características únicas da linhagem, que proporcionam vantagens reprodutivas, como maior taxa de sobrevivência, crescimento acelerado e

resistência superior a estresses bióticos e abióticos e, dessa forma, contribuem diretamente para o aumento da produtividade e lucratividade, tornando a espécie atrativa para o setor produtivo (TRAN *et al.*, 2021).

Ao contrário dos mamíferos, os peixes, especialmente os teleósteos (Teleostei) - infraclasses à qual a tilápia pertence - são notáveis por sua capacidade de reversão sexual, que ocorre quando fatores externos, como temperaturas extremas e hormônios exógenos, interferem na determinação sexual do indivíduo (SENIOR *et al.*, 2015; PALAIOKOSTAS *et al.*, 2013). Além disso, algumas espécies apresentam diferenças sexuais no crescimento e no rendimento da carcaça, o que pode ser explorado de forma vantajosa pelo setor produtivo (SENIOR *et al.*, 2012). A indústria da aquacultura utiliza esses fatores em diversas etapas da produção de peixes, gerando populações monosexo (em que todos os animais são unicamente machos ou fêmeas) para facilitar o gerenciamento da produção e evitar acasalamentos indesejados (BAROILLER; D'COTTA, 2018). No caso da tilápia, os machos são mais desejáveis para o setor produtivo, uma vez que apresentam um crescimento superior em comparação às fêmeas (CHEN *et al.*, 2017). Atualmente, o método mais utilizado para criação de populações monosexo de machos é o tratamento de larvas com ração contendo 17α -metiltestosterona, permitindo o controle da população de acordo com as necessidades de criação (EL-GREISY; EL-GAMAL, 2012).

O aumento na produção de tilápia no Brasil traz novos desafios e oportunidades. Embora o tratamento hormonal para a reversão sexual seja amplamente difundido na indústria e não resulte em resíduos no peixe produzido, existem aspectos críticos associados a esse processo que precisam ser considerados (MLALILA *et al.*, 2015; ISLAM *et al.*, 2024). É importante notar que a maioria dos consumidores não tem conhecimento de que a tilápia passa pelo processo de tratamento hormonal na fase larval, o que pode gerar distorções quanto à percepção do consumidor sobre a segurança dos produtos (MLALILA *et al.*, 2015; ISLAM *et al.*, 2024). Por outro lado, os resíduos hormonais podem afetar a qualidade da água, a biodiversidade e a segurança dos trabalhadores (BISWAS *et al.*, 2005; LI; WANG, 2017). Por essa razão, métodos alternativos para a criação de populações monosexo de tilápia, que não dependem de esteroides sexuais para reversão sexual, foram desenvolvidos, apresentando grande potencial produtivo (BAROILLER *et al.*, 2009a). Uma dessas alternativas envolve o cruzamento de machos genotípicos YY, chamados "supermachos", com fêmeas

genotípicas XX, o que resulta em uma prole exclusivamente masculina (XY), sem a utilização de hormônios exógenos (BAROILLER; D'COTTA, 2018).

Na aquacultura, marcadores moleculares associados ao sexo são amplamente empregados em testes diagnósticos com base em análises de DNA (LIU *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2021). Diversas técnicas têm sido utilizadas, incluindo marcadores microssatélites, polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado (AFLP) e análise de loci de características quantitativas (QTL), entre outros métodos (WU *et al.*, 2021). No entanto, é importante destacar que incompatibilidades entre o genótipo sexual e o fenótipo não são incomuns, uma vez que a reversão sexual pode ser induzida, tornando a identificação de genes relacionados à determinação do sexo em peixes um processo complexo (PALAIOKOSTAS *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2021; CNAANI *et al.*, 2008).

O sistema de determinação do sexo da tilápia-do-Nilo é do tipo heterogamético, no qual os machos possuem os cromossomos sexuais XY e as fêmeas apresentam cromossomos sexuais XX, podendo ser influenciado por fatores ambientais como a temperatura (PALAIOKOSTAS *et al.*, 2013; CNAANI *et al.*, 2008). Os cruzamentos realizados entre diversas linhagens comerciais e populações selvagens que foram fundamentais na criação da tilápia GIFT são apontados como a origem das discrepâncias observadas entre o sexo fenotípico e os resultados dos testes moleculares para a determinação do sexo, conforme relatado na literatura (TASLIMA *et al.*, 2020). Diversos autores, como os estudos de Jiang *et al.* (2021), Sun *et al.* (2014), Sissao *et al.* (2019), Eshel *et al.* (2010) e de Lee *et al.* (2003) demonstraram concordâncias que variaram de 76% a 97,8% entre o sexo observado e a sexagem com marcadores moleculares, dependendo da amostragem avaliada. Falhas nos processos de identificação molecular do sexo da tilápia podem impactar negativamente o processo de produção de supermachos e, por consequência, a obtenção de populações exclusivamente compostas por machos (JIANG *et al.*, 2021; SUN *et al.*, 2014; SISSAO *et al.*, 2019; ESHEL *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2003).

Métodos de sexagem molecular com acurácias mais altas são necessários para assegurar o manejo adequado dos cruzamentos necessários para a criação e identificação de supermachos. Portanto, iniciativas que se dediquem à identificação de marcadores sexo-específicos mais precisos para tilápias, com base no germoplasma disponível no

Brasil, especialmente na linhagem GIFT, têm o potencial de trazer benefícios significativos para a produção da espécie e para o mercado da aquacultura no país.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

- Identificar marcadores moleculares sexo-específicos de alta acurácia para sexagem de *O. niloticus* utilizando como base o germoplasma disponível no Brasil.

1.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia de marcadores sexo-específico, já descritos na literatura e desenvolvidos nesse trabalho, em germoplasma de tilápia-do-Nilo cultivados no Brasil.

- Conduzir um estudo de associação genômica ampla utilizando amostras de germoplasma de tilápia-do-Nilo encontradas no Brasil, com o objetivo de identificar regiões genômicas específicas para machos e/ou fêmeas, em particular para os casos em que a sexagem molecular é atípica, ou seja, quando o sexo fenotípico não corresponde ao diagnóstico molecular obtido por meio dos testes atualmente disponíveis.

1.3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1. Aspectos gerais da tilápia-do-Nilo

A tilápia-do-Nilo (**Figura 1**), *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), pertence à família dos ciclídeos (Cichlidae). Todas as espécies pertencentes a essa família compartilham uma característica em comum: a fusão dos ossos faríngeos inferiores em uma única estrutura (HULSEY *et al.*, 2005; BURRESS, 2015). Assim, por meio de um conjunto de músculos, os ossos faríngeos superiores e inferiores funcionam como um segundo conjunto de mandíbulas, auxiliando no processamento de alimentos (HULSEY *et al.*, 2005; BURRESS, 2015). A classificação taxonômica de *O. niloticus* (ITIS, 2024) é a seguinte:

Reino – Animalia

Subreino – Bilateria

Infrareino – Deuterostomia

Filo – Chordata

Subfilo – Vertebrata

Infrafilo – Gnathostomata

Superclasse – Actinopterygii

Classe – Teleostei

Superordem – Acanthopterygii

Ordem – Perciformes

Subordem – Labroidei

Família – Cichlidae

Gênero – *Oreochromis*

Espécie – *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)



Figura 1. Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Fonte: Schüür (2015).

A espécie apresenta uma dieta onívora, oportunista e generalista. Em ambientes naturais, a alimentação consiste principalmente em plâncton (incluindo fitoplâncton e zooplâncton), macrófitas, insetos aquáticos, nematoides e sedimentos (HUSSIAN *et al.*, 2019; WAGAW *et al.*, 2022; TEMESGEN, 2022). No cativeiro, rações artificiais que contêm proteínas de origem vegetal e/ou animal são utilizadas para alimentação das tilápias (EL-SAYED, 2006).

A *O. niloticus* possui alta capacidade de adaptação, o que permitiu a colonização de diferentes habitats, preferindo águas doces tropicais com temperaturas entre 27° e 30°C, mas com aptidão para sobreviver e reproduzir em águas salobras com salinidade moderada e com temperaturas variando entre 10° a 42°C (EL-SAYED, 2006; HASSAN *et al.*, 2013). O sistema reprodutivo da espécie é poligínico, caracterizado pelo acasalamento de um macho com mais de uma fêmea em um mesmo período e, além disso, os machos exibem comportamento agressivo para estabelecer e defender um território (um *lek*), onde as fêmeas depositam seus ovos (GONÇALVES-DE-FREITAS *et al.*, 2019; FESSEHAYE *et al.*, 2006). Após a desova, as fêmeas recolhem os ovos com a boca e a incubação ocorre via intrabucal, com duração superior a 14 dias até a liberação dos

alevinos no ambiente (GONÇALVES-DE-FREITAS *et al.*, 2019; FESSEHAYE *et al.*, 2006). A maturidade sexual em tanques de criação é atingida entre cinco e seis meses de idade, com algumas linhagens amadurecendo mais tarde do que outras (FAO, 2024c). Na aquacultura, espécimes com oito meses ou mais são considerados mais adequados para a reprodução (ALI *et al.*, 2024).

A colonização pela espécie em diversos tipos de ambientes ao longo dos anos resultou em diferentes respostas na morfologia e desenvolvimento de *O. niloticus* que, eventualmente, levou à subespeciação (LOWE-MCCONNELL, 1982; TREWAVAS, 1983). A descrição baseada em análises ecomorfológicas das subespécies foi feita por Trewavas (1983), resultando em sete subespécies conhecidas: *O. niloticus baringoensis*, *O. niloticus cancellatus*, *O. niloticus eduardianus*, *O. niloticus filoa*, *O. niloticus niloticus*, *O. niloticus sugutae* e *O. niloticus vulcani*.

De acordo com dados disponíveis, a cultura da tilápia-do-Nilo começou no Egito há aproximadamente 1500 anos a.C. (EL-SAYED, 2013; TELETCHEA; FONTAINE, 2014). A distribuição natural da espécie é em grande parte do continente africano e em algumas regiões do Oriente Médio. De acordo com Trewavas (1983), a origem e a distribuição natural da espécie (**Figura 2**) abrangem os rios costeiros em Israel, no Oriente Médio, e diversos lagos africanos, como o lago Alberto e o lago Eduardo (localizados na fronteira entre Uganda e a República Democrática do Congo), o lago Tana (na Etiópia), o lago Kivu (entre a República Democrática do Congo e Ruanda), o lago Tanganica (na divisa da Tanzânia, República Democrática do Congo, Burundi e Zâmbia), o lago Turkana (entre a Etiópia e Quênia) e o lago Baringo (no Quênia). Ademais, a espécie é encontrada nos lagos do Grande Vale do Rift, na Etiópia, bem como nos rios Awash (Etiópia), Suguta (Quênia) e Omo (Etiópia), além da bacia do Nilo e seus afluentes. Na África Ocidental, a espécie é naturalmente distribuída nas bacias hidrográficas dos rios Benué, Senegal, Volta, Níger, Gâmbia, além do lago Chade (TREWAVAS, 1983; EL-SAYED; FITZSIMMONS, 2023). Com o crescimento da aquacultura, a relevância da espécie para o mercado e a alta tolerância a diversas condições ambientais, a tilápia-do-Nilo foi introduzida em outras regiões tropicais, subtropicais e temperadas a partir da segunda metade do século XX (EKNATH; HULATA, 2009; GELETU; ZHAO, 2022).

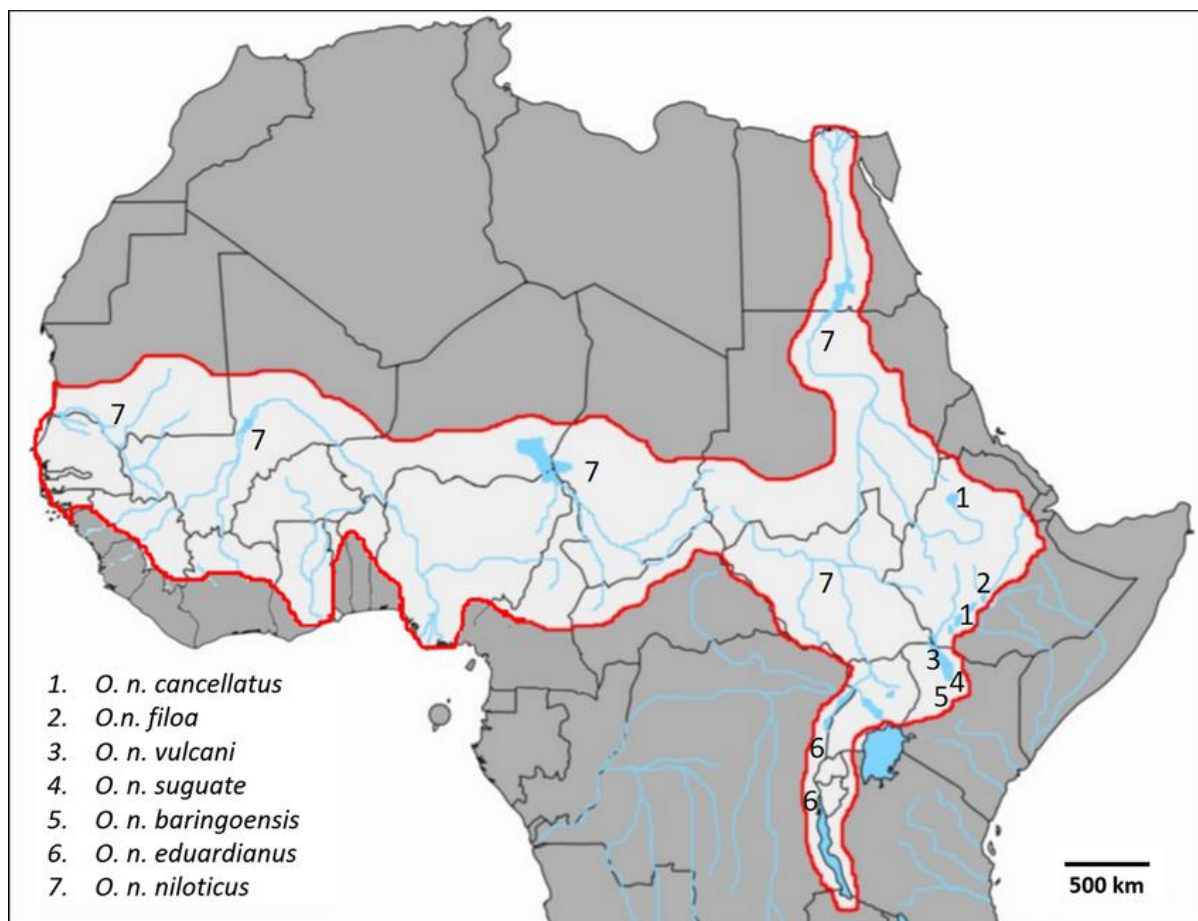


Figura 2. Origem e distribuição natural de *O. niloticus* e suas subespécies. Fonte: Geletu e Zhao (2022).

As características mencionadas tornam a *Oreochromis niloticus* uma espécie visada pela piscicultura e aquacultura, devido à sua notável capacidade de adaptação a uma variedade de ambientes e sistemas de produção (BENTSEN *et al.*, 2017; HOUSTON *et al.*, 2020). Além disso, a espécie se destaca como modelo para estudos genéticos aplicados à aquacultura, abrangendo desde programas de melhoramento genético até a preservação de recursos genéticos (HOUSTON *et al.*, 2020; BROAD INSTITUTE, 2024).

1.3.2. A linhagem GIFT

Em muitos países, a Revolução Verde que ocorreu nas décadas de 1960 e 1970 — que incluiu sementes geneticamente modificadas, insumos industriais, tecnologia agrícola aprimorada para os processos de plantio e colheita e a redução do uso de mão-de-obra — resultou em melhorias significativas na produtividade das colheitas (PINGALI *et al.*, 2012). O melhoramento genético de várias espécies de plantas, gado e peixes de climas temperados como o salmão avançou significativamente, mas até a década de 1980,

não havia tentativas para desenvolver linhagens melhoradas ou técnicas de melhoramento genético para peixes tropicais (ACOSTA; GUPTA, 2004; ACOSTA; GUPTA, 2010).

Na década de 1970, a tilápia-do-Nilo foi levada para o continente asiático para criação em pequena escala, mas devido à deriva genética, endogamia e introgressão genética causadas pelo manejo inadequado na reprodução, a produção não foi bem-sucedida (BENTSEN *et al.*, 1998; ACOSTA; GUPTA, 2004; ACOSTA; GUPTA, 2010). Sendo assim, a organização internacional WorldFish Center (antigo International Center for Living Aquatic Resources Management, ou ICLARM) localizada na Malásia, em colaboração com instituições parceiras nas Filipinas e na Noruega, lançou um projeto intitulado *Genetically Improved Farmed Tilapia* (GIFT) em abril de 1988 para o desenvolvimento de estratégias para o melhoramento genético de peixes tropicais importantes para a aquacultura, utilizando a tilápia como espécie modelo (EKNATH *et al.*, 1993).

A *O. niloticus* foi selecionada devido a sua robustez, curto tempo de geração e importância para a aquacultura (ACOSTA; GUPTA, 2010; WORLD FISH CENTER, 2024). Para isso, foi realizada a reprodução seletiva tradicional como estratégia para o melhoramento genético e, como nenhum gene de uma espécie foi transferido para outra durante o desenvolvimento da linhagem GIFT, ela não pode ser considerada um organismo geneticamente modificado (OGM) (ACOSTA; GUPTA, 2004; ACOSTA; GUPTA, 2010). Oito populações de tilápia-do-Nilo foram empregadas no programa, incluindo quatro linhagens selvagens africanas (do Egito, Quênia, Senegal e Gana) e quatro linhagens comerciais asiáticas (da Tailândia, Singapura, Taiwan e Israel) (ACOSTA; GUPTA, 2004; ACOSTA; GUPTA, 2010; WORLD FISH CENTER, 2024).

O objetivo principal do projeto GIFT visou criar uma população base de tilápia-do-Nilo mais produtiva e com maior diversidade genética, selecionando características como alta taxa de crescimento, e distribuí-la para piscicultores por meio de programas nacionais e regionais (PULLIN *et al.*, 1991; EKNATH *et al.*, 1993). O projeto também incluiu etapas para documentar recursos genéticos da espécie na Ásia e África, avaliar o germoplasma em diferentes condições, capacitar profissionais e desenvolver diretrizes para manejo genético e programas de reprodução, com metodologias aplicáveis a outras espécies de peixes (PULLIN *et al.*, 1991; EKNATH *et al.*, 1993). O projeto inicial terminou em 1997 após cinco gerações de seleção, mas um programa foi estabelecido e vem sendo ajustado ao longo dos anos (BENTSEN *et al.*, 2017).

No início do projeto GIFT, a produção mundial de aquacultura de tilápia-do-Nilo era de aproximadamente 132 mil toneladas (FAO, 2024a). Desde então, esse volume cresceu significativamente, alcançando 5,3 milhões de toneladas em 2022 (FAO, 2024a). Inúmeros estudos sugerem que a disseminação e adoção de GIFT aumenta a produção aquícola, melhora os retornos econômicos para os produtores, eleva a taxa de sobrevivência dos peixes, reduz o tempo de produção, gera maior peso dos animais, além de reduzir custos operacionais, diminuir os preços do pescado e gerar empregos e renda em áreas rurais (DEY *et al.*, 2000; ADB, 2005; PONZONI *et al.*, 2007; KHAW *et al.*, 2008; ACOSTA; GUPTA, 2010; PONZONI *et al.*, 2011; BENTSEN *et al.*, 2017; TRAN *et al.*, 2021).

De acordo com Bentsen e colaboradores (2017), o projeto resultou em uma resposta significativa na taxa de crescimento durante cinco gerações de seleção, em torno de 10% a 14% por geração. Ponzoni *et al.* (2011) observou um aumento de até 24% no peso da filetagem, indiciando que houve um aumento em uma parte do corpo com alto valor de mercado, o filé, e não em um componente corporal com menor valor. Num estudo comparativo, Tran *et al.* (2021) demonstrou que a linhagem GIFT teve uma taxa de crescimento de 27-36% mais rápida que outras linhagens de tilápia em tanques de monocultura e policultura. Em ambientes comparáveis, o ADB (2005), sigla para o *Asian Development Bank*, reportou que a produção de GIFT *on-farm* apresentou 17,5% a mais de peso corporal na China, 34,2% nas Filipinas e 57,9% em Bangladesh, quando comparadas com linhagens localmente cultivadas.

Além disso, a tecnologia e metodologias utilizadas para a criação da linhagem GIFT também têm sido usadas para melhorar a composição genética de outras espécies de peixes como o barbo de Java (*Barbonymus gonionotus*) em Bangladesh e na Tailândia, o rohu (*Labeo rohita*) na Índia e em Bangladesh, a carpa-comum (*Cyprinus carpio*) e a mrigal (*Cirrhinus mrigala*) no Vietnã e a dourada (*Megalobrama amblycephala*) na China (ADB, 2005; ACOSTA; GUPTA, 2010).

Em março de 2005, a estação experimental da Universidade Estadual de Maringá (UEM), no Paraná, recebeu tilápias representando 30 famílias da linhagem GIFT, como parte de um projeto em colaboração com o WorldFish Center e com o apoio da Secretaria Especial de Aquacultura e Pesca (SEAP), atual Ministério da Pesca e Aquacultura (MPA) (LUPCHINSKI JÚNIOR *et al.*, 2008). Essa iniciativa marcou o Brasil como o primeiro

país da América Latina a receber tilápias geneticamente melhoradas, promovendo a implementação da linhagem GIFT no país (LUPCHINSKI JÚNIOR *et al.*, 2008).

1.3.3. Produção mundial e brasileira de tilápia-do-Nilo

A tilapicultura no Brasil iniciou-se na década de 1970 com a introdução da tilápia-do-Nilo e a tilápia-de-Zanzibar (*Oreochromis urolepis hornorum*) promovida pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) para repovoamento de reservatórios na região Nordeste (KUBITZA, 2003; SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017). Durante a década de 1980, houve crescimento com foco na produção de alevinos destinados ao repovoamento, comercialização junto a produtores rurais e para a pesca esportiva (KUBITZA, 2003; BARROSO *et al.*, 2019). No entanto, foi apenas na década de 1990 que a produção de tilápia se consolidou, impulsionada pela adoção da tecnologia de reversão sexual, que marcou o início da industrialização do cultivo da espécie no Brasil (KUBITZA, 2003; CALIXTO *et al.*, 2020).

É importante destacar as tendências e os rumos futuros da aquacultura, bem como apresentar um panorama global, com ênfase no Brasil, que possui vastos recursos hídricos com grande potencial para o desenvolvimento da aquacultura continental, além de uma das maiores extensões costeiras do mundo (CALIXTO *et al.*, 2020; VALENTI *et al.*, 2021). O país detém quase 6% da área de terras emersas do planeta, 4% da superfície global de corpos d'água continentais e 16% dos recursos hídricos renováveis do planeta, o que lhe confere uma vantagem estratégica no avanço da aquacultura (BARROSO *et al.*, 2019).

O Brasil ocupa a décima terceira posição na produção mundial de aquacultura, com um volume de aproximadamente 738 mil toneladas (FAO, 2024b). Considerando apenas a produção em áreas terrestres (produção *inland*), o país sobe para a oitava posição global, com cerca de 616 mil toneladas (FAO, 2024b). Em termos regionais, o Brasil é o terceiro maior produtor de aquacultura nas Américas, detendo cerca de 15% da produção total da região – estando atrás apenas do Chile, que lidera com 30,4%, seguido de Equador, com 22,6%, mas à frente dos Estados Unidos, que representam 9,6% da produção regional (FAO, 2024b).

Comercialmente, a tilápia-do-Nilo é a segunda espécie mais importante de peixes, depois da carpa-do-limo (*Ctenopharyngodon idellus*), com uma produção global de 5,3 milhões de toneladas em 2022 (FAO, 2024b). Quando comparada a todas as espécies de

animais aquáticos, a produção de *O. niloticus* vem em quarto lugar, atrás somente do camarão cinza (*Litopenaeus vannamei*, 6,8 milhões de toneladas), das ostras (*Crassostrea* spp., 6,2 milhões de toneladas) e da carpa-do-limo (6,2 milhões de toneladas) (FAO, 2024). O Brasil fica em quarto lugar dentre os maiores produtores da espécie, com uma produção de 408,350 toneladas, atrás somente da China (1,288,947 toneladas), Indonésia (1,249,220 toneladas) e Egito (964,196 toneladas) (FAO, 2024a). O mercado de produtos de animais aquáticos movimentou US\$ 7,9 bilhões em 1976, com uma taxa média de crescimento anual de 7,2% em termos nominais e 4,0% em termos reais, atingindo um valor recorde de US\$ 192 bilhões em 2022 (FAO, 2024b).

O crescimento contínuo da aquicultura no Brasil apresentou um aumento expressivo de 328% entre 2000, com uma produção de 172,450 toneladas, e 2022, alcançando 738,881 toneladas, conforme dados do FAO (2024a) (**Figura 3**). A produção de tilápia-do-Nilo destacou-se ainda mais, com um crescimento de cerca de 1158% em comparação ao ano 2000, 87% em relação a 2015 e aproximadamente 13% em relação a 2021 (**Figura 4**). Dessa forma, a espécie passou a representar 55,3% da produção total da aquicultura no Brasil em 2022, um aumento considerável em relação ao 37,6% observado em 2010 e do 18,9% em 2000. De acordo com dados da Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE BR, 2023), os estados com maior produção de tilápia são Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul, respectivamente.



Figura 3. Crescimento da produção da aquicultura no Brasil ao longo dos anos. Fonte: o próprio autor, com dados retirados de FAO (2024a).

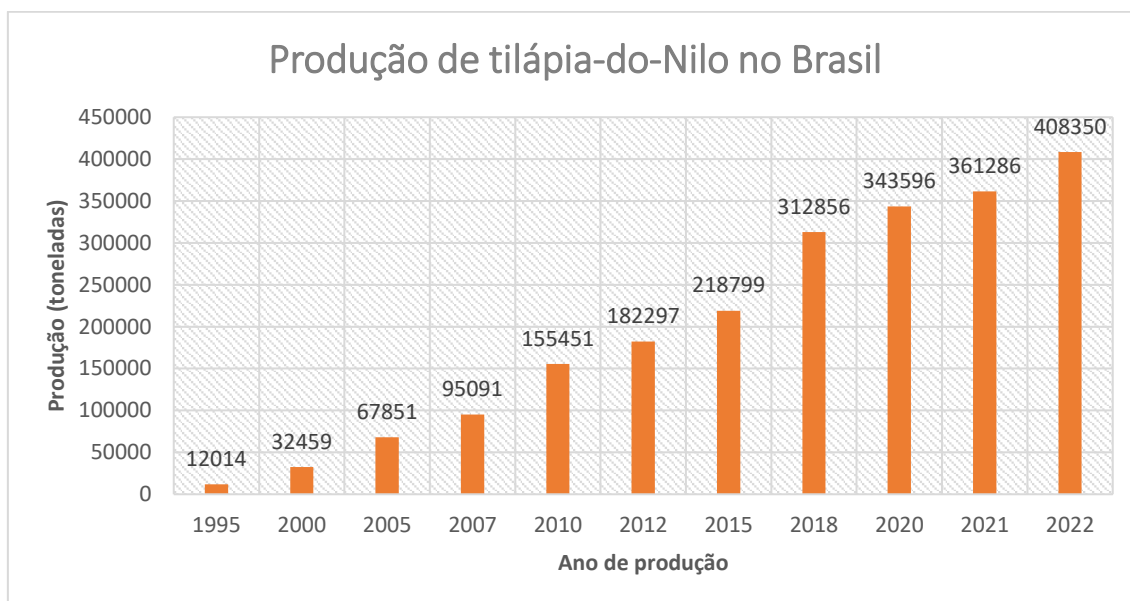


Figura 4. Crescimento da produção de tilápia-do-Nilo no Brasil ao longo dos anos.

Fonte: o próprio autor, com dados retirados de FAO (2024a).

Ainda em 2022, o valor de mercado total da aquicultura no Brasil (**Figura 5**) atingiu aproximadamente US\$ 1,6 bilhões, representando um aumento de 31% em relação ao ano anterior – US\$ 1,2 bilhões em 2021 (FAO, 2024a). A *O. niloticus* foi responsável por US\$ 672 milhões desse total (**Figura 6**), registrando um crescimento de 31,9% em comparação com 2021 – US\$ 510 milhões (FAO, 2024a). No mesmo ano, o faturamento das exportações da piscicultura brasileira cresceu 15%, somando US\$ 23,8 milhões, apesar de uma queda de 13% no volume exportado, de 9806 toneladas em 2021 para 8492 toneladas em 2022 (PEIXE BR, 2023). A tilápia, que representou 98% das exportações do setor, manteve-se como a espécie mais exportada, totalizando US\$ 23,2 milhões, um aumento de 28% em relação ao ano anterior (PEIXE BR, 2023). O aumento no valor das exportações, apesar da redução no volume, reflete o crescimento na exportação de produtos com maior valor agregado, como filés de tilápia frescos e/ou congelados, em detrimento de peixes inteiros congelados, que possuem menor valor (BARROSO *et al.*, 2019; PEIXE BR, 2023). O acentuado crescimento na exportação de filés frescos é atribuído, principalmente, à vantagem comparativa do Brasil em termos de proximidade geográfica com os Estados Unidos, o maior mercado internacional de tilápia (BARROSO *et al.*, 2019; PEIXE BR, 2023). São Paulo se destaca como o principal estado exportador de tilápia no Brasil, enquanto os Estados Unidos são o principal destino dessas exportações (BARROSO *et al.*, 2019; PEIXE BR, 2023).

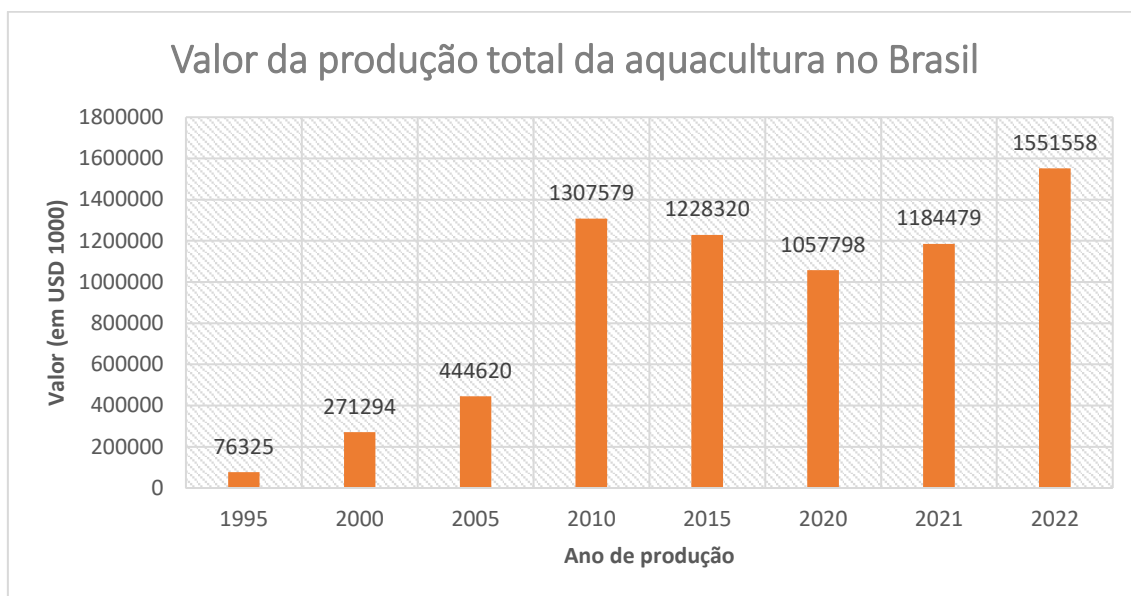


Figura 5. Valor da produção total da aquacultura no Brasil. Fonte: o próprio autor, com dados retirados de FAO (2024a).

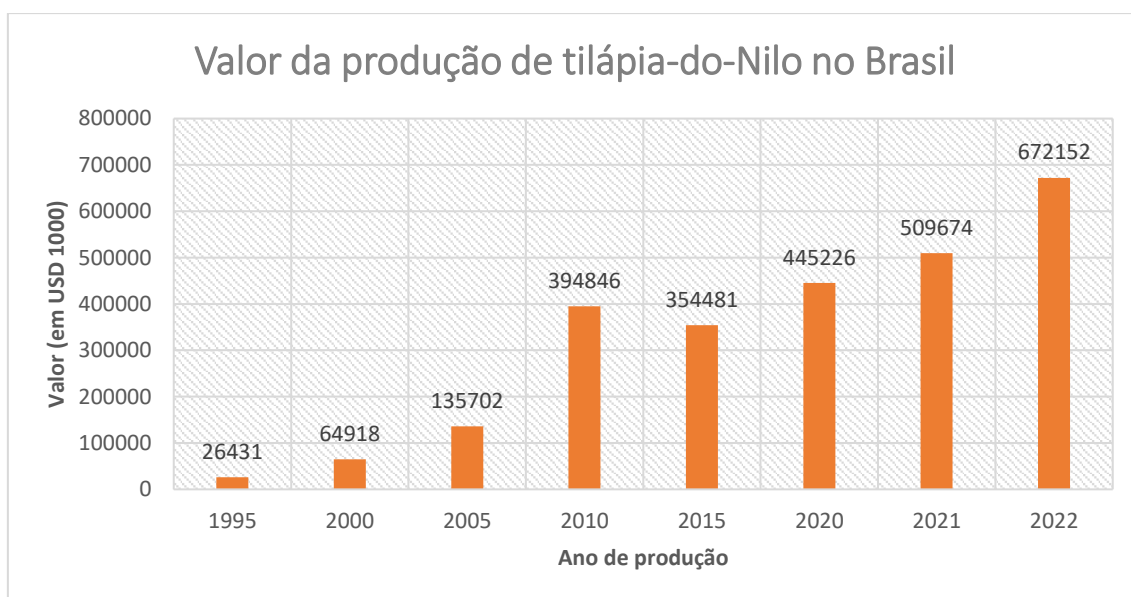


Figura 6. Valor da produção de tilápia-do-Nilo no Brasil. Fonte: o próprio autor, com dados retirados de FAO (2024a).

A crescente produção global de aquacultura resulta em uma significativa geração de subprodutos, que podem representar entre 30% e 70% do peso dos peixes, dependendo da espécie e do método de processamento utilizado (PEÑARUBIA *et al.*, 2023). No entanto, esses subprodutos, que incluem cabeças, peles, ossos, escamas e vísceras, oferecem oportunidades para uma utilização sustentável (PEÑARUBIA *et al.*, 2023;

FAO, 2024b). Ricos em proteínas de alta qualidade, vitaminas e minerais, esses materiais apresentam grande valor para a nutrição humana e podem ser transformados em produtos como farinha, gelatina, óleo de peixe e biodiesel (PATCHIMPET *et al.*, 2020; PEÑARUBIA *et al.*, 2023). Além disso, os subprodutos possuem alto potencial biotecnológico e farmacêutico devido à presença de biocompostos, como colágeno, peptídeos e ácidos graxos, que podem ser aplicados em áreas médicas (JAYATHILAKAN *et al.*, 2012; PEÑARUBIA *et al.*, 2022). A pele de tilápia, por exemplo, possui aplicações tanto na indústria alimentícia quanto na medicina, podendo ser utilizada no tratamento de queimaduras e até mesmo para a fabricação de artigos duráveis por meio do seu couro (JAYATHILAKAN *et al.*, 2012; VERDE *et al.*, 2021; PEÑARUBIA *et al.*, 2022). Embora esses produtos derivados possam ter menor valor econômico inicial, o alto volume de produção e o desenvolvimento de itens de alta tecnologia e valor agregado representam um caminho essencial para a indústria (FAO, 2024b). Ampliar o uso desses subprodutos para fins humanos contribui não apenas para a segurança alimentar e redução do desperdício, mas também para o crescimento contínuo da aquacultura, atendendo à crescente demanda global por produtos de origem aquática (FAO, 2024b).

O consumo per capita de peixes no Brasil permanece relativamente baixo, com uma média de cerca de 10 kg por pessoa anualmente, sendo 4,35 kg provenientes da aquacultura (PEIXE BR, 2024). Esse valor é inferior à média global de 20,6 kg por pessoa, que representa um aumento de 126,4% em relação aos 9,1 kg por pessoa registrados em 1961 (FAO, 2024b). Apesar de estar abaixo da média mundial, o consumo per capita de animais aquáticos no Brasil cresceu 45% entre 2014 (3 kg) e 2022 (4,35 kg) (PEIXE BR, 2024). A tilápia, especificamente, teve um aumento expressivo de 93,2%, com o consumo per capita passando de 1,47 kg em 2014 para 2,84 kg em 2023 (PEIXE BR, 2024).

A FAO (2024) projeta um crescimento contínuo na produção mundial de pesca e aquacultura, estimando que o volume total alcance 205 milhões de toneladas em 2032, representando um aumento de 19 milhões de toneladas, ou 10%, em relação a 2022 (FAO, 2024b). Grande parte desse crescimento será impulsionada pela aquacultura, cuja produção deverá atingir 111 milhões de toneladas em 2032 (FAO, 2024b). A indústria global, como um todo, deverá crescer 17%, o que corresponde a aproximadamente 16 milhões de toneladas adicionais em comparação aos níveis de 2022 (FAO, 2024b). O

consumo per capita aparente de alimentos provenientes de organismos aquáticos está projetado para aumentar de cerca de 20,6 kg em 2022 para 21,3 kg em 2032 (FAO, 2024b). Um relatório publicado pelo Banco Mundial (World Bank Group) também prevê que a produção global de tilápia atinja 7,3 milhões de toneladas até 2030, um aumento considerável comparado aos 4,3 milhões de toneladas registradas em 2010 e aos 5,3 milhões de toneladas em 2022 (WORLD BANK GROUP, 2013). No contexto brasileiro, a produção oriunda da aquacultura deverá crescer 7,6% ao longo dos próximos anos, passando de 738 mil toneladas em 2022 para 794 mil toneladas em 2032 (FAO, 2024b).

1.3.4. Determinação de sexo, reversão sexual e populações monossexo de machos

1.3.4.1. Determinação do sexo em peixes

Os sistemas de determinação e diferenciação sexual em peixes são caracterizados por sua flexibilidade e complexidade, devido à frequente ocorrência de hermafroditismo e reversão sexual natural (HEULE *et al.*, 2014). O mecanismo prevalente de determinação sexual em peixes é a determinação sexual genotípica (DSG), na qual o sexo é definido por fatores genéticos principais, como sistemas cromossômicos (heterogamético masculino – XX/XY ou heterogamético feminino – WZ/ZZ) (PENMAN; PIFERRER, 2008; PIFERRER; GUIGUEN, 2008). Além disso, também ocorre a determinação sexual ambiental (DSE), em que o sexo é determinado após a fertilização, sob influência de fatores ambientais como temperatura, pH e densidade populacional (PENMAN; PIFERRER, 2008; PIFERRER; GUIGUEN, 2008; HEULE *et al.*, 2014).

É fundamental distinguir entre determinação sexual e diferenciação sexual: a determinação sexual refere-se ao processo pelo qual o sexo de um organismo é estabelecido por fatores genéticos e/ou ambientais, enquanto a diferenciação sexual abrange os mecanismos moleculares, genéticos e fisiológicos responsáveis pelo desenvolvimento de machos ou fêmeas a partir do zigoto (KOBAYASHI; NAGAHAMA, 2009; RAJENDIRAN *et al.*, 2021). Dessa forma, os genes determinantes do sexo regulam a cascata de diferenciação gonadal, resultando na formação de ovários ou testículos (KOBAYASHI; NAGAHAMA, 2009).

A **Figura 7** mostra um diagrama do processo de determinação e diferenciação sexual em peixes. A enzima esteroidogênica P450 aromatase (*cyp19a1*) e o *dmrt1* (*doublesex and mab-3 related transcription factor 1*) são os principais reguladores da

diferenciação sexual em peixes, desempenhando papéis cruciais na diferenciação das gônadas em ovários e testículos, respectivamente (PIFERRER; GUIGUEN, 2008; KOBAYASHI *et al.*, 2008). A *cyp19a1* é a responsável pela conversão de andrógenos em estrogênios e, portanto, determina o equilíbrio entre esses esteroides sexuais. A diferenciação sexual em fêmeas está associada à estimulação da *cyp19a1* por meio de um ciclo de *feedback* positivo mediado pelo fator de transcrição *foxl2* (PIFERRER; GUIGUEN, 2008; KOBAYASHI *et al.*, 2013). Em contraste, a diferenciação sexual masculina é caracterizada pela inibição da expressão da *cyp19a1*, resultante da regulação positiva do *dmrt1* (PIFERRER; GUIGUEN, 2008; KOBAYASHI *et al.*, 2013). Esta regulação positiva do *dmrt1* é influenciada tanto por genes determinantes do sexo quanto por fatores ambientais, como altas temperaturas (PIFERRER; GUIGUEN, 2008; BAROILLER *et al.*, 2009b). O ambiente pode influenciar a diferenciação sexual por meio do sistema neuroendócrino, agindo tanto na modulação da regulação da expressão gênica e da produção hormonal mediada pelo sistema nervoso central quanto por meio de alterações ambientais diretas que afetam a produção hormonal (PENMAN; PIFERRER, 2008; KOBAYASHI *et al.*, 2008; POONLAPHDECHA *et al.*, 2013). Essa influência é particularmente significativa em *cyp19a1*, que, como mencionado anteriormente, desempenha um papel crucial na conversão de andrógenos em estrogênios (PENMAN; PIFERRER, 2008; KOBAYASHI *et al.*, 2008).

A tilápia-do-Nilo apresenta um sistema complexo de determinação sexual, envolvendo a interação entre fatores genéticos e ambientais (CNAANI *et al.*, 2008). A espécie apresenta um sistema de determinação sexual heterogamético masculino (XX/XY), no qual fatores ambientais também desempenham um papel na diferenciação sexual por meio da reversão sexual (CNAANI *et al.*, 2008; KOBAYASHI *et al.*, 2008). Além disso, os cromossomos sexuais da tilápia parecem estar em um estágio inicial de diferenciação, uma vez que não existem diferenças morfológicas significativas entre os pares de cromossomos que permitam a identificação clara dos cromossomos X e Y (LEE *et al.*, 2003). A diversidade dos mecanismos de determinação sexual nessa espécie, aliada à demanda por sistemas de cultivo de indivíduos de um único sexo (monosexo) tem incentivado pesquisas na área (SINGH, 2013).

Em *O. niloticus*, a expressão gonadal de *foxl2* e *cyp19a1* em fêmeas (XX) e de *dmrt1* em machos (XY) durante as fases iniciais do desenvolvimento (5 a 6 dias após a eclosão) é considerada crucial para a diferenciação das gônadas indiferenciadas em

ovários ou testículos, respectivamente (IJIRI *et al.*, 2008). Durante esse período, variáveis ambientais, como a temperatura ou tratamentos hormonais, podem influenciar a proporção sexual da população (IJIRI *et al.*, 2008).

O dimorfismo sexual no crescimento é comum em peixes e possui grande importância para a aquacultura (PIFERRER; GUIGUEN, 2008). Esse fator motiva o interesse no controle sexual, com o objetivo de produzir animais do sexo que apresenta maior taxa de crescimento, melhor eficiência na conversão alimentar ou, em alguns casos, para impedir a reprodução descontrolada na fase de engorda, otimizando a produção (PIFERRER; GUIGUEN, 2008; BAROILLER; D'COTTA, 2018).

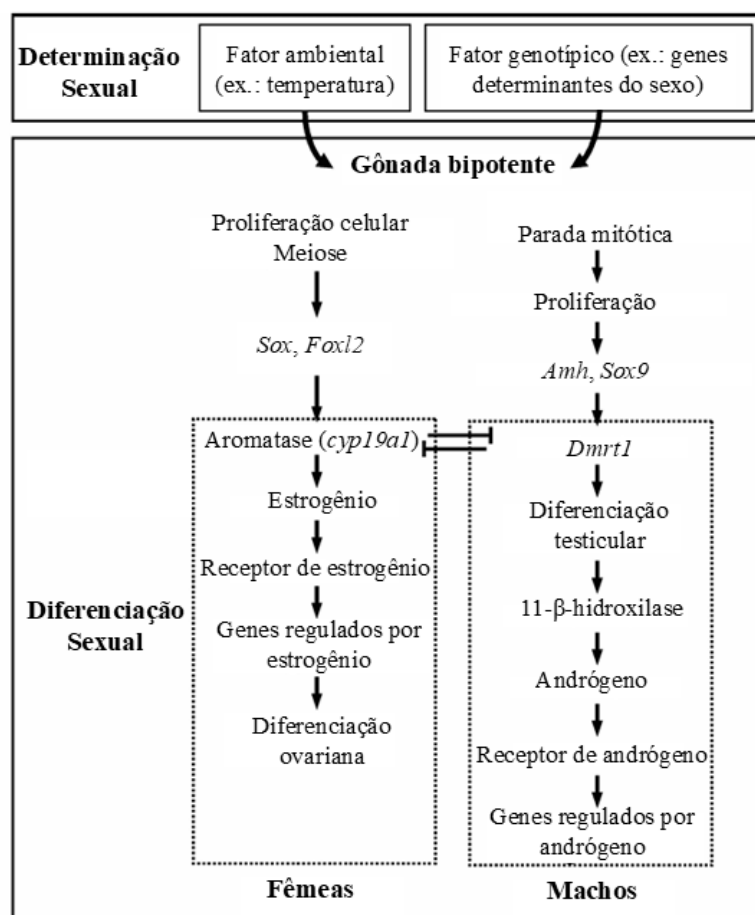


Figura 7. Esquema da determinação e diferenciação do sexo em peixes, evidenciando cascata de eventos que culminam na diferenciação gonadal de machos ou fêmeas. Fonte: adaptado de Piferrer e Guiguen (2008).

1.3.4.2. Reversão sexual

Algumas espécies de peixes, como as tilápias e garoupas (subfamília Epinephelinae), possuem a capacidade de alterar seu sexo fenotípico de maneira induzida ou natural, respectivamente, sem que haja mudanças em sua constituição genética (DUSSENNE *et al.*, 2020). Essa plasticidade sexual é amplamente explorada em sistemas de produção aquícola, em que a manipulação da temperatura da água ou a administração de esteroides sexuais exógenos durante o período crítico de diferenciação sexual permitem controlar o desenvolvimento sexual dos peixes, promovendo a masculinização ou feminização conforme necessário (BAROILLER *et al.*, 2009a; BAROILLER *et al.*, 2009b, BAROILLER; D'COTTA, 2018).

No caso de *O. niloticus*, o período crítico para a diferenciação sexual ocorre até 20 dias pós-fertilização (dpf), sendo o intervalo ideal entre 9 e 15 dpf (IJIRI *et al.*, 2008; BAROILLER *et al.*, 2009b). Durante essa fase, tanto a temperatura elevada quanto os tratamentos hormonais podem influenciar a proporção sexual (IJIRI *et al.*, 2008; BAROILLER *et al.*, 2009b). Assim, é possível induzir a formação de machos fenotípicos com genótipo XX criando os peixes em temperaturas superiores a 34°C, o que resulta em machos revertidos funcionais (BAROILLER *et al.*, 1995; BAROILLER *et al.*, 2009a). Esse processo ocorre porque a alta temperatura aumenta a expressão dos genes *dmrt1* e *amh*, suprimindo ao mesmo tempo o gene *foxl2* e as transcrições do receptor de hormônio folículo estimulante (FSHR) (POONLAPHDECHA *et al.*, 2013). Como consequência, há uma supressão da expressão de *cyp19a1*, o que inibe a síntese de estrogênio, direcionando a diferenciação sexual para o desenvolvimento masculino (POONLAPHDECHA *et al.*, 2013). Esses efeitos da alta temperatura na diferenciação sexual também tem sido observados em populações selvagens (BAROILLER *et al.*, 2009a; BAROILLER *et al.*, 2009b).

A prática mais comum para a produção de peixes sexualmente revertidos envolve a administração de esteroides sexuais exógenos por via dietética durante o período em que as gônadas ainda são indiferenciadas (KARAKET *et al.*, 2023). Esse método pode resultar tanto em masculinização quanto em feminização completa dos indivíduos (KARAKET *et al.*, 2023). No cultivo de tilápias, a maioria dos criadores de *O. niloticus* adota tratamentos hormonais para obter populações monosexo, devido à simplicidade, eficiência e baixo custo da abordagem (BAROILLER; D'COTTA, 2018). Dentre os hormônios disponíveis, a 17 α -metiltestosterona (MT) é o andrógeno mais amplamente

utilizado na reversão sexual de tilápias, sendo preferida por sua alta eficiência na indução de masculinização, além de seu preço acessível e ampla disponibilidade (BAROILLER; D'COTTA, 2018; SARKER *et al.*, 2022; KARAKET *et al.*, 2023). Sua ação ocorre por meio da indução do aumento da expressão de *dmrt1*, e, simultaneamente, pela inibição da expressão de *cyp19a1* (DAI *et al.*, 2024). Esse mecanismo é semelhante ao observado na reversão sexual mediada por altas temperaturas (BAROILLER; D'COTTA, 2018).

Embora a utilização de hormônios exógenos, como a MT, seja uma prática eficiente na reversão sexual de tilápias, essa técnica pode apresentar impactos ambientais significativos (MLALILA *et al.*, 2015; BAROILLER; D'COTTA, 2018). Durante o tratamento, parte da ração tratada com hormônios pode ser perdida e, caso os resíduos não sejam descartados corretamente, podem ser consumidos por peixes e outros animais selvagens nos corpos d'água próximos às fazendas e criadouros (BAROILLER; D'COTTA, 2018; ISLAM *et al.*, 2024). Isso levanta preocupações sobre os possíveis efeitos na qualidade da água e na biodiversidade local (MLALILA *et al.*, 2015; ISLAM *et al.*, 2024).

No que diz respeito à saúde humana, apesar de haver certa resistência conceitual por parte dos consumidores quanto ao uso de hormônios na produção de alimentos de origem animal, estudos indicam que os níveis de MT e seus metabólitos nos tecidos dos peixes diminuem rapidamente após a suspensão da ração tratada (GREEN *et al.*, 2000; MUKTI *et al.*, 2020). Em um período de 120 a 150 dias, a concentração de MT exógena nos peixes é praticamente nula, sugerindo que o risco para a saúde humana não é significativo (GREEN *et al.*, 2000; MUKTI *et al.*, 2020).

1.3.4.3. Populações monosexo

O controle reprodutivo em peixes oferece várias aplicações na aquacultura, sendo especialmente relevante para a produção de populações monosexo, dada as diferenças de crescimento entre os sexos, o maior valor comercial de um dos sexos e a necessidade de evitar reprodução descontrolada (BAROILLER; D'COTTA, 2018). No caso das tilápias, que apresentam um dimorfismo sexual acentuado, os machos tendem a crescer mais rapidamente do que as fêmeas (BEARDMORE *et al.*, 2001; FUENTES-SILVA *et al.*, 2013). Por essa razão, a criação de populações monosexo de machos é preferida, visando otimizar o rendimento e a eficiência produtiva (BEARDMORE *et al.*, 2001; FUENTES-SILVA *et al.*, 2013).

Para gerar uma população monossexo de machos, a técnica mais utilizada envolve a utilização de esteroides sexuais aplicados durante o estágio inicial de desenvolvimento, antes da diferenciação gonadal, para induzir o desenvolvimento de machos fenotípicos (SARKER *et al.*, 2022; KARAKET *et al.*, 2023). No entanto, como mencionado no tópico 1.3.4.2, o uso generalizado de hormônios para indução da reversão sexual pode representar ameaças ao meio ambiente circundante, além de influenciar negativamente a aceitação dos produtos pelos consumidores, devido às preocupações com presença de resíduos hormonais e possíveis impactos na saúde humana e na biodiversidade local.

Um método alternativo para a produção de populações monossexo de machos envolve o cruzamento de machos genotípicos YY, conhecidos como "supermachos", com fêmeas genotípicas XX (CHEN *et al.*, 2017; BAROILLER; D'COTTA, 2018; EL-ZAEEM *et al.*, 2024). O procedimento para obter supermachos YY envolve, inicialmente, a produção de fêmeas XY por meio da reversão sexual (CHEN *et al.*, 2017; BAROILLER; D'COTTA, 2018; HARTLEY-ALCOCER; BINK, 2014). Posteriormente, essas fêmeas XY são cruzadas com machos XY normais (**Figura 8**) e, dessa forma, a prole apresentará uma proporção de 3 machos para cada 1 fêmea, com 25% dos machos sendo supermachos YY (CHEN *et al.*, 2017; BAROILLER; D'COTTA, 2018; HARTLEY-ALCOCER; BINK, 2014). Esses machos YY são viáveis e funcionais e, quando cruzados com fêmeas XX, oferecem uma estratégia eficiente e sustentável para a produção de tilápias exclusivamente masculinas, o que contribui para a maximização da produtividade e o controle reprodutivo em sistemas de produção (CHEN *et al.*, 2017; BAROILLER; D'COTTA, 2018; EL-ZAEEM *et al.*, 2024).

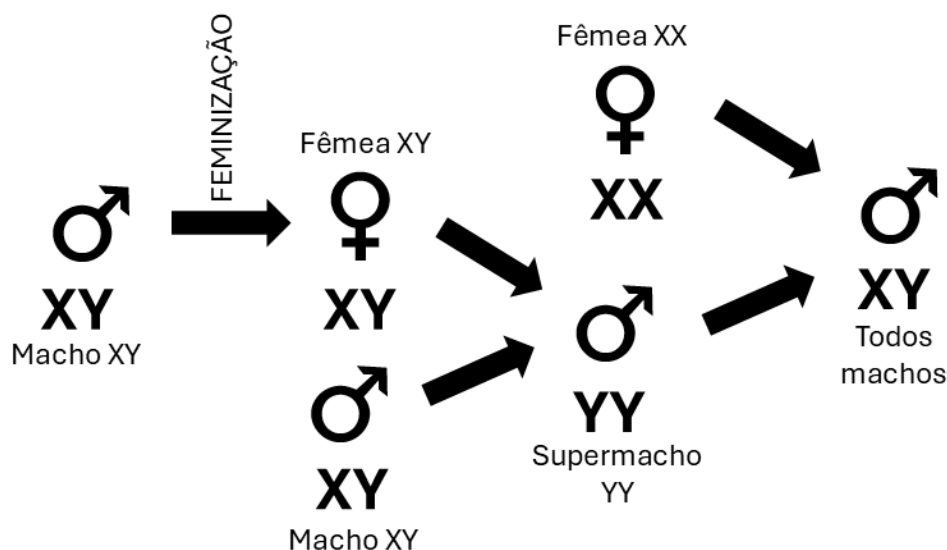


Figura 8. Esquema representando a obtenção da produção de populações monosexo de machos em tilápia-do-Nilo. Fonte: o próprio autor, adaptado de Chen *et al.* (2017).

1.3.5. Sexagem molecular e incompatibilidades na identificação do sexo

Para o desenvolvimento de populações monosexo de tilápias, é essencial identificar marcadores moleculares sexo-específicos (LIU *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2021). A principal dificuldade de se implementar a população monosexo de machos reside na dificuldade de se obter distinção precisa dos genótipos da progênie, como machos XY, fêmeas revertidas XY e supermachos YY, o que limita o progresso na criação de estoques monosexo (SUN *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2019). A seleção mediada por marcadores moleculares tem se mostrado uma estratégia eficaz para a identificação do sexo (SUN *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2019). No entanto, ainda é necessária a descoberta de marcadores moleculares mais precisos e específicos para o sexo, como evidenciado a seguir.

Um estudo feito por Lee *et al.* (2003) demonstrou que marcadores microssatélites localizados no grupo de ligação 8 (LG8) estão associados ao sexo fenotípico. Tais marcadores demonstraram prever corretamente o gênero de 95% dos indivíduos machos e fêmeas em duas das três famílias estudadas. Posteriormente, Eshel *et al.* (2010) identificou um marcador associado ao sexo masculino, mapeado no LG23, presente em 98,6% dos machos e em 8,0% das fêmeas, após a análise da correlação entre fenótipo e genótipo. Sun *et al.* (2014) realizou um estudo com marcadores moleculares localizados

no LG23 para determinar o sexo de oito populações de *O. niloticus* coletadas em diversas fazendas de peixes na China, resultando em taxas de concordância em torno de 96,8%. Sissao *et al.* (2019) relataram que a correspondência correta entre genótipos e fenótipos foi identificada em 82% dos indivíduos analisados, indicando que um locus localizado no LG23 desempenha um papel significativo como determinante do sexo masculino. No entanto, a presença de incompatibilidades entre genótipo e fenótipo sugere que outros loci também podem estar envolvidos na determinação do sexo. Em um estudo realizado por Taslima *et al.* (2020), que envolveu 19 famílias de tilápia GIFT, foi observado que os marcadores SNPs e microssatélites localizados no LG23 registram incompatibilidades de 10% a 20% entre os marcadores e o fenótipo sexual.

Palaiokostas *et al.* (2015) relataram que os marcadores localizados no LG1 explicaram cerca de 40,5% da variância fenotípica para sexo, enquanto os marcadores no LG20 foram responsáveis por aproximadamente 25% da variância fenotípica. Em uma família submetida a tratamento com alta temperatura, os marcadores no LG1 explicaram cerca de 28% da variância fenotípica, enquanto os do LG20 contribuíram com apenas 6% da variância fenotípica. Baroiller e D'Cotta (2016) realizaram a genotipagem de tilápias-do-Nilo coletadas em habitats naturais no Quênia, utilizando marcadores associados ao *amh*. Os resultados indicaram que os dados genotípicos estavam em concordância com o sexo fenotípico observado, exceto em 11% dos indivíduos considerados machos XX e 5,5% das fêmeas XY.

Além da recombinação genética entre os marcadores utilizados e o locus de determinação sexual, as discrepâncias entre o sexo fenotípico e genotípico podem ser resultado de erros na fenotipagem, bem como da influência de fatores ambientais, como temperatura, ou de efeitos de genes autossômicos (LEE *et al.*, 2003; BAROILLER; D'COTTA, 2016; CURZON *et al.*, 2020). Ademais, considerando as diversas origens da linhagem GIFT, é plausível supor que múltiplos loci estejam envolvidos na determinação do sexo (BAROILLER *et al.*, 1995, 2009b; TASLIMA *et al.*, 2020).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, Belen O.; GUPTA, Modadugu V.. From drawing board to dining table: the success story of the GIFT project. *Worldfish Center Quarterly*, Penang, Malásia, v. 27, n. 3-4, p. 4-14, dez. 2004. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12348/2057>. Acesso em: 11 jul. 2024.

ACOSTA, Belen O.; GUPTA, Modadugu V.. The Genetic Improvement of Farmed Tilapias Project: impact and lessons learned. *Success Stories In Asian Aquaculture*, [S.L.], p. 149-171, 2010. Springer Netherlands. http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-3087-0_8.

ADB, Asian Development Bank. An Impact Evaluation of the Development of Genetically Improved Farmed Tilapia and their Dissemination in Selected Countries. Manila, Filipinas: Asian Development Bank, 2005. Disponível em: <https://www.adb.org/publications/impact-evaluation-development-genetically-improved-farmed-tilapia-and-their>. Acesso em: 22 jul. 2024.

ALI, Mohammad Shawquat *et al.* Practical training: tilapia breeding and all-male fry production. Myanmar Sustainable Aquaculture Programme - Mysap Inland, Rangun, Myanmar, p. 4-27, jan. 2020. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12348/4377>. Acesso em: 19 ago. 2024.

BAROILLER, J. F. *et al.* Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding Cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *Journal Of Experimental Zoology*, [S.L.], v. 273, n. 3, p. 216-223, 15 out. 1995. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jez.1402730306>.

BAROILLER, J.F. *et al.* Tilapia sex determination: where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, [S.L.], v. 153, n. 1, p. 30-38, maio 2009a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.018>.

BAROILLER, J.F. *et al.* Environmental Effects on Fish Sex Determination and Differentiation. *Sexual Development*, [S.L.], v. 3, n. 2-3, p. 118-135, 2009b. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000223077>.

BAROILLER, Jean-François; D'COTTA, Helena. The Reversible Sex of Gonochoresis Fish: insights and consequences. *Sexual Development*, [S.L.], v. 10, n. 5-6, p. 242-266, 2016. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000452362>.

BAROILLER, Jean-François; D'COTTA, Helena. Sex Control in Tilapias. *Sex Control In Aquaculture*, [S.L.], p. 189-234, 2 nov. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/9781119127291.ch9>.

BARROSO, Renata Melon *et al.* Social and economic performance of tilapia farming in Brazil. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, Roma, Itália, v. 1181, p. 1-40, 2019.

BENTSEN, Hans B. *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, [S.L.], v. 160, n. 1-2, p. 145-173, jan. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(97\)00230-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(97)00230-5).

BENTSEN, Hans B. *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: response to five generations of selection for increased body weight at harvest in *Oreochromis niloticus* and the further impact of the project. *Aquaculture*, [S.L.], v. 468, p. 206-217, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.018>.

BEARDMORE, J.A *et al.* Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, [S.L.], v. 197, n. 1-4, p. 283-301, jun. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00590-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00590-7).

BISWAS, Amal K. *et al.* Control of reproduction in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) by photoperiod manipulation. *Aquaculture*, [S.L.], v. 243, n. 1-4, p. 229-239, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.10.008>.

BROAD INSTITUTE. Tilapia Genome Project. Disponível em: <https://www.broadinstitute.org/tilapia/tilapia-genome-project>. Acesso em: 20 dez. 2024.

BURRESS, Edward D. Ecological diversification associated with the pharyngeal jaw diversity of Neotropical cichlid fishes. *Journal Of Animal Ecology*, [S.L.], v. 85, n. 1, p. 302-313, 30 nov. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2656.12457>.

CALIXTO, Eduardo Soares *et al.* Aquaculture in Brazil and worldwide: overview and perspectives. *Journal Of Environmental Analysis And Progress*, [S.L.], v. 5, n. 1, p.

098-107, 26 fev. 2020. Journal of Environmental Analysis and Progress - JEAP. <http://dx.doi.org/10.24221/jeap.5.1.2020.2753.098-107>.

CHEN, Jinlin *et al.* A Review of Genetic Advances Related to Sex Control and Manipulation in Tilapia. Journal Of The World Aquaculture Society, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 277-291, 19 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jwas.12479>.

CHEN, Chao-Hao *et al.* Marker-assisted selection of YY supermales from a genetically improved farmed tilapia-derived strain. **Zoological Research** [S.L.], v. 40, n. 2, p. 108-112, 2019. Zoological Research. <http://dx.doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2018.071>.

CNAANI, A. *et al.* Genetics of Sex Determination in Tilapiine Species. Sexual Development, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 43-54, 2008. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000117718>.

CURZON, A. Y. *et al.* A duplication of the Anti-Müllerian hormone gene is associated with genetic sex determination of different *Oreochromis niloticus* strains. Heredity, [S.L.], v. 125, n. 5, p. 317-327, 9 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41437-020-0340-x>.

DEY, Madan Mohan *et al.* Performance and nature of genetically improved farmed tilapia: a bioeconomic analysis. Aquaculture Economics & Management, [S.L.], v. 4, n. 1-2, p. 83-106, nov. 2000. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/13657300009380262>.

DAI, Shengfei *et al.* Dmrt1 Is Responsible for Androgen-Induced Masculinization in Nile Tilapia. Genes, [S.L.], v. 15, n. 9, p. 1238, 23 set. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes15091238>.

DUSSENNE, M. *et al.* Consequences of temperature-induced sex reversal on hormones and brain in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Hormones And Behavior, [S.L.], v. 121, p. 104728, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104728>.

EKNATH, Ambekar E. *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. Aquaculture, [S.L.], v. 111, n. 1-4, p. 171-188, abr. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90035-w](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(93)90035-w).

EKNATH, Ambekar E.; HULATA, Gideon. Use and exchange of genetic resources of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Reviews In Aquaculture, [S.L.], v. 1, n. 3-4, p. 197-213, set. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-5131.2009.01017.x>.

EL-GREISY, Z.A.; EL-GAMAL, A.e.. Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 α -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment. Egyptian Journal Of Aquatic Research, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 59-66, 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejar.2012.08.005>.

EL-SAYED, Abdel-Fattah M. Tilapia Culture. Cambridge, MA, EUA: Cabi Publishing, 2006. 277 p.

EL-SAYED, A.-F.M. On-farm feed management practices for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Egypt. In M.R. Hasan and M.B. New, eds. On-farm feeding and feed management in aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 583. Rome, FAO. pp. 101–129. 2013.

EL-SAYED, Abdel-Fattah M.; FITZSIMMONS, Kevin. From Africa to the world—The journey of Nile tilapia. Reviews In Aquaculture, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 6-21, fev. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12738>.

EL-ZAEEM, Samy Y. et al. A New Investigation to Discriminate Sexes in Alive Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Using Cyp19a1a and Dmrt1 Gene Expression in Tail Fin Tissues. Marine Biotechnology, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 943-950, 28 jun. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-024-10340-w>.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de Inteligência e Mercado em Aquacultura (CIAqui): Produção da aquacultura e piscicultura brasileira por espécie. 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/cim-centro-de-inteligencia-e-mercado-em-aquacultura/producao-brasileira/categorias>. Acesso em: 03 mar. 2024.

ESHEL, O. et al. Fine-mapping of a locus on linkage group 23 for sex determination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Animal Genetics, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 222-224, 27 out. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02128.x>.

FAO, Food and Agriculture Organization. FishStat: Global aquaculture production 1950-2022. In: FishStatJ. Acesso em 29 mar. 2024a. Disponível em: www.fao.org/fishery/en/statistics/software/fishstatj. Licence: CC-BY-4.0.

FAO, Food And Agriculture Organization. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024: blue transformation in action. FAO, [S.L.], p. 1-219, 7 jun. 2024b. FAO. <http://dx.doi.org/10.4060/cd0683en>.

FAO, Food And Agriculture Organization. *Oreochromis niloticus*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Rakocy, J. E.. In: Fisheries and Aquaculture. 2024c. Disponível em: https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/oreochromis_niloticus. Acesso em: 05 ago. 2024.

FESSEHAYE, Yonas *et al.* Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: a microsatellite analysis. Aquaculture, [S.L.], v. 256, n. 1-4, p. 148-158, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.024>.

FUENTES-SILVA, Carlos *et al.* Male tilapia production techniques: A mini-review. African Journal Of Biotechnology, [S. L.], p. 5496-5502, set. 2013. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.4119>.

GELETU, Temesgen Tola; ZHAO, Jinliang. Genetic resources of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) in its native range and aquaculture. Hydrobiologia, [S.L.], v. 850, n. 10-11, p. 2425-2445, 22 set. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-022-04989-4>.

GONÇALVES-DE-FREITAS, Eliane *et al.* Social Behavior and Welfare in Nile Tilapia. Fishes, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 23, 27 mar. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/fishes4020023>.

GREEN, Bartholomew W. *et al.* Human Food Safety and Environmental Assessment of the Use of 17 α -Methyltestosterone to Produce Male Tilapia in the United States. Journal Of The World Aquaculture Society, [S.L.], v. 31, n. 3, p. 337-357, set. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.2000.tb00885.x>.

HARTLEY-ALCOCER, Adrian G.; BINK, Eric N.. Potential of YY male tilapia technology: process avoids hormone usage and maintains strain purity in genetically

normal males. Process avoids hormone usage and maintains strain purity in genetically normal males. 2014. Global Seafood Alliance. Disponível em: <https://www.globalseafood.org/advocate/potential-of-yy-male-tilapia-technology/>. Acesso em: 20 dez. 2024.

HASSAN, B. *et al.* Environmental isotonicity improves cold tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in Egypt. Egyptian Journal Of Aquatic Research, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 59-65, 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejar.2013.03.004>.

HEULE, Corina *et al.* Genetics of Sexual Development: an evolutionary playground for fish. Genetics, [S.L.], v. 196, n. 3, p. 579-591, 1 mar. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.114.161158>.

HOUSTON, Ross D. *et al.* Harnessing genomics to fast-track genetic improvement in aquaculture. Nature Reviews Genetics, [S.L.], v. 21, n. 7, p. 389-409, 16 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-020-0227-y>.

HULSEY, C Darrin. Function of a key morphological innovation: fusion of the cichlid pharyngeal jaw. Proceedings Of the Royal Society B: Biological Sciences, [S.L.], v. 273, n. 1587, p. 669-675, 6 dez. 2005. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2005.3375>.

HUSSIAN, Abd-Ellatif M. *et al.* Feeding on phytoplankton profile of two African Cichlids in large reservoir, Lake Nasser, Egypt. Egyptian Journal Of Aquatic Biology And Fisheries, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 451-464, 1 nov. 2019. Egypts Presidential Specialized Council for Education and Scientific Research. <http://dx.doi.org/10.21608/ejabf.2019.57921>.

IJIRI, Shigeho *et al.* Sexual Dimorphic Expression of Genes in Gonads During Early Differentiation of a Teleost Fish, the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*¹. Biology Of Reproduction, [S.L.], v. 78, n. 2, p. 333-341, 1 fev. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.107.064246>.

ISLAM, Purba *et al.* Steroid hormones in fish, caution for present and future: a review. Toxicology Reports, [S.L.], v. 13, p. 101733, dez. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2024.101733>.

ITIS. Integrated Taxonomic Information System. On-line database. Disponível em: www.itis.gov, CC0. <https://doi.org/10.5066/F7KH0KBK>. Acesso em: 16 jul. 2024.

JAYATHILAKAN, K. *et al.* Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *Journal Of Food Science And Technology*, [S.L.], v. 49, n. 3, p. 278-293, 20 fev. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-011-0290-7>.

JIANG, Dong-Neng *et al.* Polymorphism in a sex-linked DNA marker located on LG23 in Hainan strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal Of The World Aquaculture Society*, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 205-223, 3 jun. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jwas.12815>.

KARAKET, Thuchapol *et al.* The optimum dose and period of 17 α -methyltestosterone immersion on masculinization of red tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture And Fisheries*, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 174-179, mar. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aaf.2021.09.001>.

KHAW, Hooi Ling *et al.* Estimation of genetic change in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by comparing contemporary progeny produced by males born in 1991 or in 2003. *Aquaculture*, [S.L.], v. 275, n. 1-4, p. 64-69, mar. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.01.022>.

KOBAYASHI, Tohru *et al.* Sexual dimorphic expression of DMRT1 and Sox9a during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Developmental Dynamics*, [S.L.], v. 237, n. 1, p. 297-306, 19 dez. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.21409>.

KOBAYASHI, T.; NAGAHAMA, Y.. Molecular Aspects of Gonadal Differentiation in a Teleost Fish, the Nile Tilapia. *Sexual Development*, [S.L.], v. 3, n. 2-3, p. 108-117, 2009. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000223076>.

KOBAYASHI, Y. *et al.* Diversity and Plasticity of Sex Determination and Differentiation in Fishes. *Sexual Development*, [S.L.], v. 7, n. 1-3, p. 115-125, 31 ago. 2013. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000342009>.

KUBITZA, F. A evolução da tilapicultura no Brasil: produção e mercado. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, mar./abr. 2003.

LEE, B.-Y. *et al.* Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis. *Animal Genetics*, [S.L.], v. 34, n. 5, p. 379-383, 18 set. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2052.2003.01035.x>.

LI, Minghui; WANG, Deshou. Gene editing nuclease and its application in tilapia. *Science Bulletin*, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 165-173, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scib.2017.01.003>.

LIU, Haiyang *et al.* Sex-specific markers developed by next-generation sequencing confirmed an XX/XY sex determination system in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Dna Research*, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 257-264, 5 jan. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/dsx054>.

LOWE-MCCONNELL, R.s.V. PULLIN; R.H. The Biology and Culture of Tilapias. Manila, Filipinas: ICLARM, 1982. Disponível em: <https://digitalarchive.worldfishcenter.org/handle/20.500.12348/3606>. Acesso em: 02 ago. 2024.

LUPCHINSKI JÚNIOR, Enio *et al.* Avaliação da variabilidade das gerações G0 e F1 da linhagem GIFT de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por RAPD. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 233-240, 7 ago. 2008. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v30i2.4708>.

MUKTI, Akhmadtaufiq *et al.* Residual impact of 17 α -methyltestosterone and histopathological changes in sex- reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Asian Pacific Journal Of Reproduction*, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 37, 2020. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/2305-0500.275527>.

POUNDS, Alexandra *et al.* More Than Fish—Framing Aquatic Animals within Sustainable Food Systems. *Foods*, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 1413, 13 maio 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods11101413>.

PALAIOKOSTAS, Christos *et al.* Mapping and Validation of the Major Sex-Determining Region in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Using RAD Sequencing. *Plos One*, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 68389, 11 jul. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068389>.

PALAIOKOSTAS, Christos *et al.* A novel sex-determining QTL in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bmc Genomics*, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-9, 11 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-1383-x>.

PATCHIMPET, Jaran *et al.* Optimization of process variables for the production of biodiesel by transesterification of used cooking oil using lipase from Nile tilapia viscera. *Renewable Energy*, [S.L.], v. 153, p. 861-869, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.039>.

PEIXE BR. Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário Peixe BR da Piscicultura 2023. 126 p. Peixe BR, São Paulo. 2023. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario/>. Acesso em: 10 ago. 2024.

PEIXE BR. Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário Peixe BR da Piscicultura 2024. 120 p. Peixe BR, São Paulo. 2024. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario/>. Acesso em: 09 ago. 2024.

PEÑARUBIA, Omar *et al.* How value addition by utilization of tilapia processing by-products can improve human nutrition and livelihood. *Reviews In Aquaculture*, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 32-40, 5 dez. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12737>.

PENMAN, David J.; PIFERRER, Francesc. Fish Gonadogenesis. Part I: genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Reviews In Fisheries Science*, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 16-34, 15 set. 2008. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10641260802324610>.

PIFERRER, Francesc; GUIGUEN, Yann. Fish Gonadogenesis. Part II: molecular biology and genomics of sex differentiation. *Reviews In Fisheries Science*, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 35-55, 15 set. 2008. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10641260802324644>.

PINGALI, Prabhu L. *et al.* Green Revolution: impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 109, n. 31, p. 12302-12308, 31 jul. 2012. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0912953109>.

PONZONI, Raul W. *et al.* Investment appraisal of genetic improvement programs in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, [S.L.], v. 269, n. 1-4, p. 187-199, set. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.054>.

PONZONI, Raul W. *et al.* Genetic improvement of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with special reference to the work conducted by the WorldFish Center with the GIFT strain. *Reviews In Aquaculture*, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 27-41, 23 fev. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01041.x>.

POONLAPHDECHA, Srisupaph *et al.* Temperature induced-masculinisation in the Nile tilapia causes rapid up-regulation of both *dmrt1* and *amh* expressions. *General And Comparative Endocrinology*, [S.L.], v. 193, p. 234-242, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.007>.

PULLIN, Roger S. V. *et al.* The Genetic Improvement of Farmed Tilapias (GIFT) project: the story so far. *The Iclarm Quarterly*, [S. L.], v. 14, n. 2, p. 3-6, abr. 1991. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12348/3118>. Acesso em: 16 jul. 2024.

RAJENDIRAN, Preetha *et al.* Sex Determination and Differentiation in Teleost: roles of genetics, environment, and brain. *Biology*, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 973, 27 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biology10100973>.

SARKER, Baadruzzoha *et al.* Optimization of 17 α -methyltestosterone dose to produce quality mono-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Heliyon*, [S.L.], v. 8, n. 12, p. 12252, dez. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12252>.

SCHULTER, Eduardo Pickler; VIEIRA FILHO, José Eustáquio Ribeiro. *Evolução da piscicultura no brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia*. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – Ipea, Rio de Janeiro, Brasil, p. 7-32, ago. 2017.

SCHÜÜR, Germano Roberto. Tilápia ou *Sarotherodon niloticus* 2: ciclídeo originário do rio nilo. 2015. Wikimedia Commons. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Til%C3%A1pia_ou_Sarotherodon_niloticus_2.jpg. Acesso em: 16 abr. 2024.

SENIOR, Alistair McNair *et al.* The fitness consequences of environmental sex reversal in fish: a quantitative review. *Biological Reviews*, [S.L.], v. 87, n. 4, p. 900-911, 27 abr. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185x.2012.00230.x>.

SENIOR, Alistair McNair *et al.* Ecological and Evolutionary Applications for Environmental Sex Reversal of Fish. *The Quarterly Review Of Biology*, [S.L.], v. 90, n. 1, p. 23-44, mar. 2015. University of Chicago Press. <http://dx.doi.org/10.1086/679762>.

SINGH, Atul K. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes. *General And Comparative Endocrinology*, [S.L.], v. 181, p. 146-155, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.08.027>.

SISSAO, Rokyatou *et al.* Mismatches between the genetic and phenotypic sex in the wild Kou population of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Peerj*, [S.L.], v. 7, p. 7709, 18 set. 2019. PeerJ. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.7709>.

SIQUEIRA, T. V. Aquacultura: a nova fronteira para produção de alimentos de forma sustentável. *Revista do BNDES*, Rio de Janeiro, v.25, n.49, p. 119-170, jun. 2018. Disponível em: <http://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/16085>. Acesso em: 06 mar. 2024.

SUN, Yun-Lv *et al.* Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, [S.L.], v. 433, p. 19-27, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.035>.

TACON, Albert G. J.; METIAN, Marc. Fish Matters: importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. *Reviews In Fisheries Science*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 22-38, jan. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10641262.2012.753405>.

TASLIMA, Khanam *et al.* Sex determination in the GIFT strain of tilapia is controlled by a locus in linkage group 23. *Bmc Genetics*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 21-49, 29 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12863-020-00853-3>.

TELETCHÉA, Fabrice; FONTAINE, Pascal. Levels of domestication in fish: implications for the sustainable future of aquaculture. *Fish And Fisheries*, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 181-195, 21 set. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/faf.12006>.

TEMESGEN, Mathewos *et al.* Food and Feeding Biology of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Lake Langeno, Ethiopia. *Sustainability*, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 974, 15 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/su14020974>.

TRAN, Nhung *et al.* Growth, yield and profitability of genetically improved farmed tilapia (GIFT) and non-GIFT strains in Bangladesh. *Aquaculture*, [S.L.], v. 536, p. 736486, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736486>.

TREWAVAS, E. Tilapiine Fishes of the Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis*, and *Danakilia*. Londres: British Museum Of Natural History, 1983. Disponível em: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/215113#page/1/mode/1up>. Acesso em: 16 jul. 2024.

VALENTI, Wagner C. *et al.* Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquaculture Reports*, [S.L.], v. 19, p. 100611, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100611>.

VERDE, Maria Elisa Quezado Lima *et al.* Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) for burn treatment: ultrastructural analysis and quantitative assessment of collagen. *Acta Histochemica*, [S.L.], v. 123, n. 6, p. 151762, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151762>.

WAGAW, Solomon *et al.* Diet composition and feeding habits of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in Lake Shala, Ethiopia. *Fisheries And Aquatic Sciences*, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 20-30, jan. 2022. The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science. <http://dx.doi.org/10.47853/fas.2022.e3>.

WORLD BANK GROUP. FISH TO 2030: prospects for fisheries and aquaculture. Agriculture And Environmental Services Department Discussion Paper; no. 3. Washington, D.C, EUA. p. 1-75, dez. 2013. Disponível em: <http://documents.worldbank.org/curated/en/458631468152376668/Fish-to-2030-prospects-for-fisheries-and-aquaculture>. Acesso em: 09 ago. 2024.

WORLD FISH CENTER. Genetically Improved Farmed Tilapia (GIFT). Disponível em: <https://worldfishcenter.org/pages/gift/>. Acesso em: 20 dez. 2024.

WU, Xin *et al.* Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in blue tilapia (*Oreochromis aureus*). *Aquaculture*, [S.L.], v. 530, p. 735934, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735934>.

ZHENG, Shuqing *et al.* Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in the Southern catfish (*Silurus meridionalis*). *Aquaculture*, [S.L.], v. 517, p. 734783, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734783>.

CHAPTER 2

IDENTIFICATION OF SEX-SPECIFIC MARKERS IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) USING GERMPLASM AVAILABLE IN BRAZIL

2.1. RESUMO

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES SEXO-ESPECÍFICOS DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) UTILIZANDO GERMOPLASMA BRASILEIRO

Káifer José Soares Silva¹, Nayelle Meyre Lisboa Silva², Orzenil Bomfim da Silva Junior³, Patrícia Ianella⁴, Alexandre Rodrigues Caetano⁵

1. Biotecnologista / Mestrando em Ciências Animais – PPGCA/Universidade de Brasília (UnB) – Brasília/DF
2. Bióloga / Doutora em Ciências Animais – PPGCA/Universidade de Brasília (UnB) – Brasília/DF
3. Físico / Doutor – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília/DF
4. Bióloga / Doutora – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília/DF
5. Zootecnista / Doutor – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília/DF

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é atualmente a segunda espécie mais importante para a aquacultura mundial, sendo o Brasil, o quarto maior produtor global da espécie. A linhagem GIFT, desenvolvida a partir do cruzamento de várias linhagens para maximizar a produtividade, é a mais cultivada no Brasil. Os machos apresentam maior crescimento em comparação às fêmeas, e por isso, populações monosexo de machos são desenvolvidas utilizando-se protocolos hormonais. Tais protocolos podem impactar o ambiente, e por isso, uma alternativa para produção de populações monosexo, como o uso de supermachos (YY) é de interesse do setor. Os supermachos ao serem cruzados com fêmeas normais (XX), produzem apenas machos, no entanto, a eficácia desse método depende da identificação de marcadores moleculares capazes de distinguir com precisão o sexo dos peixes. Devido às múltiplas origens genéticas da linhagem GIFT e ao seu complexo sistema de determinação sexual, que também pode ser influenciado por fatores ambientais, a identificação de marcadores moleculares 100% precisos tem sido um processo desafiador. Para abordar essa questão, o presente estudo utilizou amostras de animais da linhagem GIFT disponíveis no Brasil, realizando um estudo de associação

genômica ampla (GWAS) para identificar marcadores moleculares, considerando possíveis fontes de discrepância entre genótipo e fenótipo. O marcador Amh_EVII foi selecionado para a genotipagem devido à sua elevada sensibilidade, especificidade, acurácia e qualidade. Após a genotipagem, os indivíduos foram divididos em quatro categorias com base na concordância ou discordância entre os sexos fenotípico e molecular. Seis grupos foram analisados no GWAS: (1) machos e fêmeas com sexo fenotípico e genotípico concordantes; (2) machos e fêmeas com sexo fenotípico e genotípico discordantes; (3) machos concordantes comparados a machos discordantes; (4) fêmeas concordantes comparadas a fêmeas discordantes; (5) machos concordantes comparados a fêmeas discordantes; e (6) fêmeas concordantes comparadas a machos discordantes. Como esperado para a linhagem GIFT e confirmado por estudos anteriores, o SDL localizado no LG23 foi detectado, além de marcadores no LG5. Os resultados obtidos indicam uma associação estreita entre dezessete marcadores no LG23 e a determinação sexual, enquanto os marcadores no LG5 requerem estudos adicionais.

PALAVRAS-CHAVE: determinação do sexo, GIFT, GWAS, reversão sexual, SNPs.

2.2. ABSTRACT

IDENTIFICATION OF SEX-SPECIFIC MARKERS IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) USING GERMPLASM AVAILABLE IN BRAZIL

Káifer José Soares Silva¹, Nayelle Meyre Lisboa Silva², Orzenil Bomfim da Silva Junior³, Patrícia Ianella⁴, Alexandre Rodrigues Caetano⁵

1. Biotechnologist / Master's student in Animal Sciences – University of Brasília (UnB) – Brasília/BR
2. Biologist / Doctor in Animal Sciences – University of Brasília (UnB) – Brasília/BR
3. Physicist / Doctor – Embrapa Genetic Resources and Biotechnology – Brasília/BR
4. Biologist / Doctor – Embrapa Genetic Resources and Biotechnology – Brasília/BR
5. Zootechnician / Doctor – Embrapa Genetic Resources and Biotechnology – Brasília/BR

The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is currently the second most important species for global aquaculture, with Brazil ranking as the fourth-largest global producer of this species. The GIFT strain, developed through the crossbreeding of multiple lineages to maximize productivity, is the most widely cultivated strain in Brazil. Males exhibit faster growth than females; thus, monosex male populations are commonly produced using hormonal protocols. However, these protocols may have environmental impacts, making alternative approaches, such as the use of supermales (YY), of significant interest to the sector. When crossed with normal females (XX), supermales produce only male offspring. Nevertheless, the effectiveness of this method relies on the identification of highly precise molecular markers for accurate sex differentiation. Due to the multiple genetic origins of the GIFT strain and its complex sex determination system—potentially influenced by environmental factors—identifying 100% accurate molecular markers has been a challenging task. To address this issue, the present study analyzed samples from the GIFT strain maintained in Brazil, conducting a genome-wide association study

(GWAS) to identify molecular markers while considering potential sources of genotype-phenotype discrepancies. The *Amh_EVII* marker was selected for genotyping due to its high sensitivity, specificity, accuracy, and quality. Following genotyping, individuals were categorized into four groups based on the concordance or discordance between phenotypic and molecular sex. Six comparative groups were analyzed in the GWAS: (1) males and females with concordant phenotypic and genotypic sex; (2) males and females with discordant phenotypic and genotypic sex; (3) concordant males versus discordant males; (4) concordant females versus discordant females; (5) concordant males versus discordant females; and (6) concordant females versus discordant males. As expected for the GIFT strain and confirmed by previous studies, the sex-determining locus (SDL) was detected on linkage group 23 (LG23), along with markers on LG5. The results indicate a strong association between seventeen markers on LG23 and sex determination, while the role of markers on LG5 requires further investigation.

KEYWORDS: GIFT, GWAS, sex determination, sex reversal, SNPs.

2.3. INTRODUCTION

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a freshwater cichlid native to Africa and the Middle East and currently represents the second most produced finfish in global aquaculture, second only to common carp (TREWAVAS, 1983; FAO, 2024). In Brazil, tilapia is the leading aquaculture species, with production increasing from 155,451 tons in 2010 to 408,350 tons in 2022, accounting for 55.3% of the total national aquaculture production (EMBRAPA, 2023; FAO, 2024). Brazil is currently the fourth largest producer of farmed tilapia worldwide, following China, Indonesia, and Egypt (FAO, 2024). Given its favorable climate and abundant water resources, Brazil's tilapia farming industry has great potential to continue growing and to positively impact global food supply (SIQUEIRA, 2018; POUNDS *et al.*, 2022; TACON; METIAN, 2013; BARROSO *et al.*, 2019).

The GIFT (Genetically Improved Farmed Tilapia) tilapia strain, developed by the WorldFish Center combines genetic material from four commercial Asian strains and four wild African populations (GUPTA; ACOSTA, 2004; ADB, 2005). Since its introduction in Brazil in 2005, GIFT tilapia has represented the base for all domestic production, mainly because of its enhanced reproductive performance, faster growth, and improved resistance to biotic and abiotic stresses, leading to increased productivity and profitability in aquaculture (LUPCHINSKI JÚNIOR *et al.*, 2008; TRAN *et al.*, 2021).

Unlike mammals, many fish species, particularly teleosts like tilapia, can undergo early-life sex reversal due to environmental triggers such as increased temperature (SENIOR *et al.*, 2015; PALAIOKOSTAS *et al.*, 2013). Sex reversal can also be artificially induced with hormonal treatments, which has been commercially used to produce single-sex populations to explore secondary sexual dimorphisms associated with increased growth and production performance, in addition to limiting unwanted reproduction during grow-out (EL-GREISY; EL-GAMAL, 2012; SENIOR *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2017). In the tilapia industry, all-male populations are normally used, and although hormone treatments are commonly used to achieve this, concerns regarding consumer perception, environmental risks and worker safety have prompted the search for technical alternatives (BISWAS *et al.*, 2005; LI; WANG, 2017). The use of "supermales" (YY tilapia males) which should produce all-male offspring without the need for direct use of hormones is an alternative which has been proposed (BAROILLER; D'COTTA, 2018).

Sex-specific molecular markers, based on different types of polymorphisms such as microsatellites and single nucleotide polymorphisms (SNPs), have been developed for several aquaculture species (WU *et al.*, 2021). Marker-Assisted Selection (MAS) can be used to efficiently produce all-male populations, enabling breeders to select hormonally treated sex-reversed fish (XY females) for producing YY males (SUN *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2019). However, discrepancies observed between genotypic and phenotypic sex can be caused by genetic and environmental factors, as well as additional cis and trans-acting sex-determining genes, therefore complicating molecular diagnostic processes (PALAIOKOSTAS *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2021; CNAANI *et al.*, 2008).

Nile tilapia has an XY sex-determination system which can be influenced by environmental factors like temperature (BAROILLER *et al.*, 2009a). Considering the multiple genetic origins of most commercial strains, particularly in the GIFT lineage, discrepancies between observed phenotypic sex and molecular sex have been widely reported (CNAANI *et al.*, 2008; TASLIMA *et al.*, 2020).

Inaccuracies in molecular sex identification can adversely affect the production of supermales and therefore hinder the effective use of this technology for production of all-male commercial populations (JIANG *et al.*, 2021; SUN *et al.*, 2014; SISSAO *et al.*, 2019; ESHEL *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2003). Therefore, more precise molecular sexing markers are required for tilapia to ensure optimal breeding management. The aim of this study was to search for more accurate sex-specific markers in GIFT Nile tilapia through a genome-wide association study (GWAS) utilizing germplasm available in Brazil.

2.4. MATERIAL AND METHODS

2.4.1. FISH SAMPLING

A total of 670 Nile tilapia samples from the GIFT strain, originating from various broodstock groups from three commercial hatcheries from different regions of Brazil were used in the study (**Table 1**). Fin clips were collected from each animal and preserved in 90% ethanol until processing, as part of routine DNA testing for genetic management. All samples were phenotypically sexed by hatchery management. Samples were sent by hatchery management for zootechnical control and donated to Embrapa, with prior approval for additional studies by Embrapa's Animal Ethics Committee.

Table 1. Sampling of different genetic groups of Nile tilapia used in the study. Hatchery P3 provided fish from different families, each family represented by a genetic group.

Hatchery	Genetic group	Number of samples
P1	-	96
P2	-	96
P3	A	48
	B	64
	C	64
	D	24
	E	32
	F	96
	G	32
	H	32
	I	32
	J	30
	K	24
Total		670

2.4.2. DNA EXTRACTION

DNA was extracted from the 670 samples using a method adapted from Boyce *et al.* (1989), employing cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). Tissue punches (6mm) were excised from each fin clip and immersed in 500 µl of extraction buffer containing CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1.4 M NaCl; 0.02 M EDTA; 2% CTAB) and 0.2% 2-mercaptoethanol. Subsequently, 5 µl of proteinase K (10 ng/µl) were added, followed by incubation at 60°C for 1 hour in a dry bath. After enzymatic digestion, the solution was centrifuged at 13,000g for 2 minutes, and the supernatant was transferred to a new tube containing 500 µl of chloroform and isoamyl alcohol (24:1). The mixture was vortexed for 10 seconds and centrifuged again at 13,000g for 15 minutes. The resulting supernatant was transferred to a separate tube containing 250 µl of cold isopropanol, mixed by inversion, and stored at -20°C for a minimum of 30 minutes. DNA precipitation was achieved by centrifugation at 13,000g for 10 minutes at room temperature. The supernatant was discarded, and the DNA pellet was washed with 700 µl of cold 70%

ethanol. After removing the ethanol by decantation, the tubes were left open to air dry at room temperature. Finally, the dried pellets were resuspended in 100 µl of TE buffer (Tris-EDTA, pH 8.0) containing 6 µl of RNase A (10 mg/µl) and incubated at 37°C for 30 minutes.

2.4.3. MOLECULAR SEXING OF SAMPLES

A subset of 96 samples, all originating from hatchery P1, was initially analyzed using three different molecular sexing assays for tilapia, either previously published or developed based on unpublished data (**Table 2**). ON_SEX2 marker primers were designed based on the male-specific sequence described in patent CN103409420B (WANG *et al.*, 2013). The sequence was aligned and analyzed using Primer3 software, and a new primer was subsequently designed. The aim of this analysis was to select the marker with the highest accuracy for validating genotypic sex in the total sample set (n=670).

Table 2. Markers tested along with their respective forward (F) and reverse (R) sequences, annealing temperature (T °C), fragment sizes in males and females (b.p.: base pairs), and corresponding references.

Marker	F sequence	R sequence	T °C	Males (b.p.)	Females (b.p.)
ON_SEX2 This work.	GGTTCAGTTGGTTTAACTGGTGA	GGCCTCCTCTTCTTCTTCGT	60°C	680 240	680
Amh_E0_del Eshel <i>et al.</i> , 2014.	AGTGAGCTGGGTTGGAGTCATT	CGTCGACAACAAAGCTCAAAAC	64°C	547 386	547
Amh_EVII Taslina, 2017.	AGCAGCTCTAGCGGCATCCACA	TGTGTTTTCTTTCTGCGTCCGCCA	64°C	439 206	439

PCR products were subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel stained with Ethidium Bromide for amplified DNA product visualization. The expected banding pattern for the PCR products for all primers included a larger band common to all individuals, regardless of sex, and a smaller band specific to males — resulting in two bands for males and one band for females. The observed amplification patterns were compared to the phenotypically reported sex of each sample. Concordance and discordance patterns were analyzed to calculate the sensitivity, specificity, and accuracy

indices for each marker, enabling the selection of the marker with the highest accuracy for sex identification across all samples.

Sensitivity (1) indicates the test's ability to correctly detect male fish:

$$1. \text{ Sensitivity} = [\text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})] \times 100\%$$

Specificity (2) indicates the test's ability to correctly exclude female fish:

$$2. \text{ Specificity} = [\text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})] \times 100\%$$

Accuracy (3) assesses the proportion of all correct tests (true positives and true negatives) out of all results obtained:

$$3. \text{ Accuracy} = [(\text{TP} + \text{TN}) / n] \times 100\%$$

Where: TP – true positive (concordant males); TN – true negative (concordant females); FP – false positive (discordant females); FN – false negative (discordant males); n – total number of samples.

The observed DNA amplification pattern was used to classify each of all the remaining 574 samples as concordant male or female when there was agreement between the phenotypic sex and molecular sexing, or as discordant when there was a discrepancy between the phenotypic sex and molecular sexing.

2.4.4. SAMPLE SELECTION

All samples classified as discordant (phenotypic males with female molecular sex and vice-versa) were selected for Whole Genome Shotgun (WGS) sequencing. In addition, concordant male and female samples (with converging phenotypic and molecular sex) were chosen to serve as control groups. Samples were selected from all hatcheries and genetic groups to minimize inadvertent sampling effects. Kinship estimates obtained with a low-density SNP panel containing 96 SNPs evenly distributed across the tilapia genome (unpublished) were used to select unrelated individuals and minimize genetic sub structuring effects. The final set of selected samples (n=96) contained: 40 discordant males, 16 discordant females, 20 concordant males, 20 concordant females.

2.4.5. SAMPLE SEQUENCING AND IDENTIFICATION OF VARIANT POSITIONS

A total of 3µg of DNA from each selected sample was dried and shipped to Neogen Inc. for sequencing. An individual library was prepared for each sample using the Illumina DNA Prep kit, using proprietary library preparation and workflow to improve the cost-effectiveness of sequencing (Neogen Inc.). Final libraries were quantified with fluorometry, and library pools were assessed for quality with Fragment Analyzer (Agilent Technologies Inc.). Adapter sequences utilized for libraries were standard Illumina format. The sequencing was performed on an Illumina NovaSeq 6000 (Paired End Reads 2x150). SAMTools (LI *et al.*, 2009) was used for processing obtained reads, mapping processed reads on the Nile tilapia reference genome (GCF_001858045.2) and generating genotype calls on observed variant positions.

2.4.6. SNP DATA QUALITY CONTROL

Extracted genotypes for each individual were analyzed using SNP & Variation Suite™ v8.x (Golden Helix) – SVS. Initial quality control was performed by removing SNPs with call rate < 0.85, number of alleles > 2, and minor allele frequency (MAF) < 0.05.

2.4.7. GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES (GWAS)

GWAS were conducted using the SNP & Variation Suite™ v8.x software (Golden Helix). Six different comparisons (**Table 3**) were performed stratifying the 96 samples into different case-control groups to investigate different hypothesis regarding the phenotype/genotype discordances observed in the molecular sexing:

- **GWAS 1:** Concordant males (XY) versus concordant females (XX) was used as a positive control analysis;
- **GWAS 2:** Discordant males (XX) versus discordant females (XY);
- **GWAS 3:** Concordant males (XY) versus discordant males (XX) – to evaluate if misclassification of phenotype occurred or if sex reversal triggered by environmental factors was present;

- **GWAS 4:** Concordant females (XX) versus discordant females (XY) – to evaluate if misclassification of phenotype occurred or if sex reversal triggered by environmental factors was present;
- **GWAS 5:** Concordant males (XY) versus discordant females (XY) – to investigate if problems with molecular sexing assays generated false positives or if discordant females were generated by genetic factors besides the sex-determining locus (SDL);
- **GWAS 6:** Concordant females (XX) versus discordant males (XX) – to investigate if problems with molecular sexing assays generated false negatives or if discordant males were generated by genetic factors besides the SDL.

Table 3. Summary of the comparative groups analyzed in GWAS.

		Male		Female
		Concordant	Discordant	Discordant
Female	Concordant	GWAS 1	GWAS 6	GWAS 4
	Discordant	GWAS 5	GWAS 2	
Male	Discordant	GWAS 3		

A kinship matrix based on identity by state (IBS) was elaborated based on the SNP from each of the four experimental groups and used to correct for potential population substructure effects among individuals (KANG *et al.*, 2010). GWAS analyses were conducted using a dominant genetic model applied to a single-locus linear mixed model (EMMA – Efficient Mixed Model Association) (KANG *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2021) implemented in SVS. The model used is structured as follows:

$$Y = X\beta + Z\mu + \epsilon$$

Where: Y is a vector of phenotypes (sex); X is a matrix of fixed effects composed of genotypes of all markers; β is the vector of fixed effects (markers); Z is a matrix that relates the instances of random effects (estimated identity coefficients between all individuals); μ is the vector of random effects (kinship matrix); and ϵ represents the residual effect.

2.5. RESULTS

2.5.1. MOLECULAR SEXING ASSAYS AND SELECTED SAMPLES

Amh_EVII and Amh_E0_del showed the highest sensitivity, specificity and accuracy of all tested assays considering the initial 96 samples (**Table 4; Figure 1**). Amh_EVII was selected for subsequent analyses of additional samples because it exhibited superior amplification strength/quality (data not shown). Six males and three females exhibited discrepancies between their phenotypic and genotypic sex in the initial testing.

Table 4. Specificity, sensitivity, and accuracy of different PCR assays based on the subgroup of 96 Nile tilapia samples.

Marker	Sensitivity	Sensibility	Accuracy
ON_SEX2	79.2%	79.2%	79.2%
Amh_E0_del	87.5%	93.8%	90.6%
Amh_EVII	87.5%	93.8%	90.6%



Figure 1. Results of agarose gel electrophoresis of PCR products, performed with the Amh_EVII marker for the subgroup of 96 samples. All samples were from hatchery P1, and those highlighted in yellow indicate discrepant results — the expected result was two bands in males (439 bp and 206 bp) and one band in females (439 bp).

When applied to the entire sample set ($n = 670$), the Amh_EVII assay demonstrated a sensitivity of 85.2%, specificity of 95.7%, and accuracy of 91.5%. A total of 56 samples (40 males and 16 females) exhibited discrepancies between phenotypic and genotypic sex (**Supplementary material S1, S2**), distributed as follows: 9 samples from hatchery P1, 9 from hatchery P2, and 38 from hatchery P3. To form the control group, 40 samples (20 males and 20 females) were selected according to the criteria established in section 2.4.4 of this chapter, totaling 96 samples for the shotgun sequencing.

2.5.3. GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY

Sequencing yielded a total of 4,080,097 SNP markers, of which 3,032,136 high-quality bi-allelic SNPs remained in the final dataset after QC including MAF, SNPs and sample call rate filtering. Samples 484 and 505 were excluded from the analyses following SNP data quality control. GWAS analyses were conducted using the defined groups. To determine statistical significance, a P-value threshold of 0.05 was used, with

a Bonferroni correction applied to adjust for multiple testing [$-\log_{10}(0.05/\text{number of tests})$]. Given the similarity in the number of markers across groups, a uniform threshold of 7.78 was established for all groups. **Table 5** provides a summary of the findings, and **Figure 2** presents the Manhattan plots for each group comparison.

Table 5. SNPs significantly associated with phenotypic sex in Nile tilapia, identified in the respective comparison of groups through GWAS, based on LOD score.

Marker	Linkage group (LG)	Position	$-\log_{10}(\text{P-value})$	Comparison Group
LG23_334730215	LG23	34730215	21.4	¹ GWAS 1
LG23_34463199	LG23	34463199	19.8	GWAS 1
LG23_34441504	LG23	34441504	19.8	GWAS 1
LG23_34458454	LG23	34458454	19.8	GWAS 1
LG23_34642238	LG23	34642238	19.8	GWAS 1
*LG23_34506173	LG23	34506173	25.6	² GWAS 2
[§] LG23_34492058	LG23	34492058	18.9	GWAS 2
[†] LG23_34500364	LG23	34500364	18.5	GWAS 2
LG23_34500830	LG23	34500830	15.3	GWAS 2
LG23_34492258	LG23	34492258	15.3	GWAS 2
LG5_12571823	LG5	12571823	8.9	GWAS 2
LG5_12591073	LG5	12591073	8.2	GWAS 2
LG5_12592940	LG5	12592940	8.2	GWAS 2
LG5_12606000	LG5	12606000	8.1	GWAS 2
LG5_12600535	LG5	12600535	8.0	GWAS 2
LG23_34642746	LG23	34642746	22.3	³ GWAS 3
LG23_34642844	LG23	34642844	22.3	GWAS 3
LG23_34502864	LG23	34502864	22.1	GWAS 3
*LG23_34506173	LG23	34506173	22.1	GWAS 3
[†] LG23_34500364	LG23	34500364	21.9	GWAS 3
*LG23_34506173	LG23	34506173	16.6	⁴ GWAS 4
LG23_34730215	LG23	34730215	12.7	GWAS 4

^{\$} LG23_34492058	LG23	34492058	12.4	GWAS 4
LG23_34483274	LG23	34483274	12.1	GWAS 4
⁺ LG23_34500364	LG23	34500364	12.1	GWAS 4
LG5_23963540	LG5	23963540	7.8	⁵ GWAS 5

¹**GWAS 1** - concordant males (XY) versus concordant females (XX); ²**GWAS 2** - discordant males (XX) versus discordant females (XY); ³**GWAS 3** - concordant males (XY) versus discordant males (XX); ⁴**GWAS 4** - concordant females (XX) versus discordant females (XY); ⁵**GWAS 5** - concordant males (XY) versus discordant females (XY). * and +: SNP markers which were the most significant of the three different comparisons. \$: SNP markers which were the most significant in GWAS 2 and 4.

Some markers were identified in more than one comparison group. LG23_34506173 and LG23_34500364 appear as the most significant markers in GWAS 2, 3 and 4. Additionally, LG23_34492058 is found in both GWAS 2 and 4. A significant signal was also detected in LG5 (**Figure 2**). Overall, genomic regions strongly associated with phenotypic sex were marked by 17 significant SNPs.

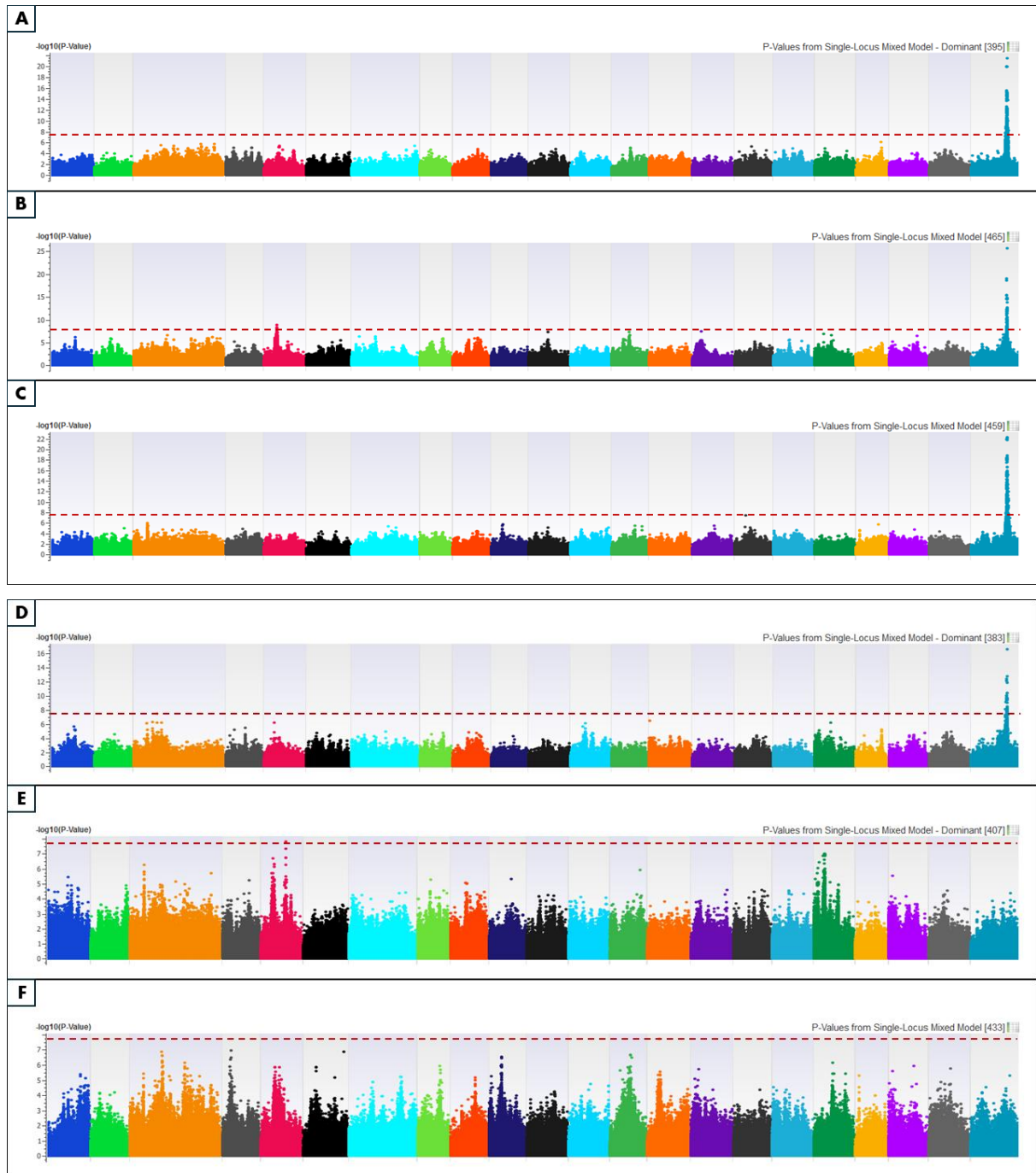


Figure 2. Manhattan plots for GWAS analyses comparing different experimental groups. The $-\log_{10}P$ score for SNP association is plotted against their position on the genetic map. Each linkage group is represented by SNPs in different colors. The significance threshold was set at 7.78. **A)** GWAS 1: concordant males (XY) versus concordant females (XX); **B)** GWAS 2: discordant males (XX) versus discordant females (XY); **C)** GWAS 3: concordant males (XY) versus discordant males (XX); **D)** GWAS 4: concordant females (XX) versus discordant females (XY); **E)** GWAS 5: concordant males

(XY) versus discordant females (XY). **F)** GWAS 6. concordant females (XX) versus discordant males (XX).

2.6. DISCUSSION

The main objective of this study was to develop highly accurate sex-specific molecular markers for sexing *O. niloticus* using germplasm available in Brazil. The chosen approach was mainly based on the need for identifying 100% accurate sex-linked markers as an essential tool for producing monosex populations without the direct use of 17 α -methyltestosterone treatment of fish destined to grow out.

Sex determination (SD) mechanisms in tilapia are highly complex, with evidence of both male (XX/XY) and female (ZZ/ZW) heterogametic systems within the genus *Oreochromis*. In addition, secondary genetic factors (polyfactorial) and environmental influences, particularly temperature, may play significant roles in shaping the sex ratio in this genus. These combined factors contribute to notable variations in SD mechanisms, observed not only across closely related tilapia species but also between and within domesticated strains and wild populations (TASLIMA *et al.*, 2024).

Several previous studies showed that LG23 plays a critical role in the evolution of sex-determining mechanisms in tilapia (ESHEL *et al.*, 2010; ESHEL *et al.*, 2012; WESSELS *et al.*, 2017; Cáceres *et al.*, 2019). Shirak *et al.* (2006) found that the *Amh* and *Dmrta2* are mapped to two distinct regions of LG23 and are associated with sex determination in Nile tilapia. Li *et al.* (2015) demonstrated that *Amhy*, a Y-specific duplicate of the *Amh* gene, also located on LG23, induces male sex determination in Nile tilapia. Curzon *et al.* (2019) showed that the effect of markers on LG23 from various Nile tilapia strains, including the Ghana, Swansea, and Thai-Chitralada, also accounted for the sex determination within these strains. Taslima *et al.* (2020) found that, despite the GIFT strain's multiple origins, sex determination in this strain was also strongly associated with a locus on LG23. Cáceres and collaborators (2019), through whole-genome sequencing of 326 individuals from three GIFT Nile tilapia populations sampled in Latin America, identified 10 SNPs in the *Amh* gene (LG23) which were associated directly or indirectly with sex determination. Furthermore, strong sex-linked signals on LG23 were found in wild populations from West and East Africa that have not been subjected to domestication or selective breeding in captivity (TRIAY *et al.*, 2020). Lastly, the red tilapia (*O. niloticus*

× *Oreochromis mossambicus* hybrid) also demonstrated significant association between LG23 and phenotypic sex characteristics in a study by Naraballoh *et al.* (2021).

In a previous study by Taslima *et al.* (2020), the Amh_EVII and Amh_E0_del markers were shown to be strongly associated with sex in GIFT tilapia. These markers consistently identified males in two GIFT families, however, in four additional genotyped families, 10-20% discordances were observed between the LG23 markers and the actual sexual phenotype. Conversely, a subsequent study (TASLIMA *et al.*, 2021) revealed that in the Stirling Nile tilapia strain, the Amh_EVII marker was detected in only 7 out of 51 male individuals (13.73%). These issues may have led to low efficacy of earlier efforts to develop YY supermales in the Stirling strain (TASLIMA *et al.*, 2021). Amplification results obtained on the initial set of 96 tilapia samples revealed accuracy rates for Amh_EVII and Amh_E0_del comparable to previous literature reports.

Several hypotheses may explain the discrepancies between phenotypic sex and molecular sexing results, including phenotyping errors, presence of sex-reversed individuals within tested samples, PCR contamination during genotyping assays, assay inefficacy (i.e. failure to amplify male-specific fragments in true males), existence of alternative trans- and cis-acting sex-determining loci or regions, or segregation of non- and sub-functional sex-determining loci (SDL). The six different GWAS analyses conducted were designed to explore these issues.

The most intuitive hypothesis to explain divergences between phenotypic and genotypic sex classifications involves phenotyping errors (KAZYAK *et al.*, 2013; LONGENECKER *et al.*, 2024). In the current dataset, sexing was visually performed by hatchery management and could not be verified secondarily. To test this hypothesis, comparisons were conducted with concordant and discordant males (GWAS 3) and concordant and discordant females (GWAS 4). The presence of a peak GWAS signal on LG23 in comparisons between phenotypically concordant and genotypically discordant individuals would support the possibility of phenotyping errors. The obtained results could not rule out that phenotyping errors may have occurred leading to misclassifications of discordant males and females.

Sex reversal, which can occur naturally in some species or be induced by external factors such as temperature or inadvertent hormone exposure during larval stages, may explain the presence of discordant individuals among the tested sample set as previously

argued by other studies (BAROILLER *et al.*, 2009b; BAROILLER; KOBAYASHI *et al.*, 2013; BAROILLER; D'COTTA, 2016). In this scenario, the results observed in comparisons conducted in GWAS 3 and GWAS 4 would resemble those expected from phenotyping errors, but the SDL would also be present in discordant individuals. The results obtained in this study could not rule out that sex reversal may have occurred in the discordant individuals analyzed.

The hypothesis of PCR contamination as a cause for false positives for the SDL, therefore leading to the misclassification of discordant females, has been previously raised (HU, 2016). PCR tests for all discordant males and females were repeated independently and the results remained consistent. Comparisons between concordant males (where the SDL is expected to be present) and discordant females (GWAS 5) should reveal a significant peak on LG23 if phenotypic females were mistakenly genotyped as males because of PCR contamination. However, GWAS 5 did not result in a significant peak on LG23, indicating PCR contamination was not the cause of the observed results.

Genotyping errors may result from intrinsic assay inefficacies, including technical errors during the genotyping process or issues related to unknown DNA sequence polymorphisms in the priming binding sites, which can lead to improper primer annealing (PADHI *et al.*, 2020). To investigate this hypothesis, comparisons between discordant males and concordant females were conducted (GWAS 6). The presence of a GWAS peak at the SDL in LG23 in discordant males would indicate that genotyping errors could be the cause of the observed deviations. No significant markers were identified in GWAS 6, therefore suggesting that genotyping errors are not responsible for the observed discordant males.

The presence of a secondary locus on a different linkage group that may influence sex determination in tilapia has been previously postulated (LEE *et al.*, 2003; ESHEL *et al.*, 2014; PALAIOKOSTAS *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2017; CURZON *et al.*, 2020) and could be a significant factor, especially in GIFT tilapia, given its diverse origins and the fact that the strain was developed by crossbreeding wild populations that typically do not interbreed in their natural habitats (SYAIFUDIN *et al.*, 2019; TASLIMA *et al.*, 2020). In this context, examining all comparison groups would be necessary to identify markers on alternative linkage groups. As our findings in GWAS 2 and GWAS 5 show LG5 harbors markers with significant effect on sex determination. No prior studies reporting markers

on LG5 associated with sex determination in tilapia were observed. Further analysis of the peak region of LG5, considering data from large segregating families, may help elucidate the role of this genomic region in tilapia sex determination.

An additional hypothesis proposes that mutations in the *Amh* gene resulting in non-functional alleles may lead genotypic males into developing as females (MORINAGA *et al.*, 2007; YAN *et al.*, 2019). To test this hypothesis, discordant females (PCR positive for the presence of the *Amh* gene) were compared with concordant females (GWAS 4). The presence of a peak at the SDL on LG23, as was observed, would suggest that defective or null alleles may be segregating in GIFT tilapia which may explain the presence of phenotypic females which have male-specific markers.

In summary, it is possible that phenotyping errors, sex reversal, the interference of an alternative linkage group in sex determination, and the presence of null alleles on the Y chromosome may have influenced the results. However, it is unlikely that contamination of samples or genotyping errors resulting from improper primer annealing occurred.

This study provides further evidence to better understand the genetic architecture of sex determination in commercial Nile tilapia populations established in Brazil. Seventeen SNPs highly associated with sex determination located in LG23 were found, corroborating that markers located on LG23 are closely associated with sex determination in GIFT tilapia Brazilian germplasm, even though additional genetic and environmental factor may generate a low percentage of animals with phenotypic sex divergent from sex predicted by molecular methods.

Further analysis and functional annotation of variants found in the region where the SNPs highly associated with sex determination were detected may bring important additional information for elucidating the causes of observed sex divergences. Identification of more accurate molecular markers would be still needed and will allow for increased sustainability and economic efficiency of tilapia breeding programs and production systems, supporting protocols to produce monosexual male populations with less dependence on direct hormonal treatments of fry destined to grow out.

REFERENCES

ACOSTA, Belen O.; GUPTA, Modadugu V.. From drawing board to dining table: the success story of the GIFT project. *Worldfish Center Quarterly*, Penang, Malásia, v. 27, n. 3-4, p. 4-14, dez. 2004. Available at: <https://hdl.handle.net/20.500.12348/2057>. Accessed: 11 jul. 2024.

ADB, Asian Development Bank. An Impact Evaluation of the Development of Genetically Improved Farmed Tilapia and their Dissemination in Selected Countries. Manila, Filipinas: Asian Development Bank, 2005. Available at: <https://www.adb.org/publications/impact-evaluation-development-genetically-improved-farmed-tilapia-and-their>. Accessed: 22 jul. 2024.

BAROILLER, J.F. *et al.* Environmental Effects on Fish Sex Determination and Differentiation. *Sexual Development*, [S.L.], v. 3, n. 2-3, p. 118-135, 2009a. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000223077>.

BAROILLER, J.F. *et al.* Tilapia sex determination: where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, [S.L.], v. 153, n. 1, p. 30-38, maio 2009b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.018>.

BAROILLER, Jean-François; D'COTTA, Helena. The Reversible Sex of Gonochoistic Fish: insights and consequences. *Sexual Development*, [S.L.], v. 10, n. 5-6, p. 242-266, 2016. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000452362>.

BAROILLER, Jean-François; D'COTTA, Helena. Sex Control in Tilapias. *Sex Control In Aquaculture*, [S.L.], p. 189-234, 2 nov. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/9781119127291.ch9>.

BARROSO, Renata Melon *et al.* Social and economic performance of tilapia farming in Brazil. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, Roma, Italy, v. 1181, p. 1-40, 2019.

BISWAS, Amal K. *et al.* Control of reproduction in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) by photoperiod manipulation. *Aquaculture*, [S.L.], v. 243, n. 1-4, p. 229-239, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.10.008>.

BOYCE, T M *et al.* Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. **Genetics**, [S.L.], v. 123, n. 4, p. 825-836, 1 dez. 1989. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/genetics/123.4.825>.

CÁCERES, Giovanna *et al.* Fine Mapping Using Whole-Genome Sequencing Confirms Anti-Müllerian Hormone as a Major Gene for Sex Determination in Farmed Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **G3 Genes|Genomes|Genetics**, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 3213-3223, 1 out. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1534/g3.119.400297>.

CHEN, Jinlin *et al.* A Review of Genetic Advances Related to Sex Control and Manipulation in Tilapia. **Journal Of The World Aquaculture Society**, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 277-291, 19 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jwas.12479>.

CHEN, Chao-Hao *et al.* Marker-assisted selection of YY supermales from a genetically improved farmed tilapia-derived strain. **Zoological Research** [S.L.], v. 40, n. 2, p. 108-112, 2019. Zoological Research. <http://dx.doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2018.071>.

CNAANI, A. *et al.* Genetics of Sex Determination in Tilapiine Species. Sexual Development, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 43-54, 2008. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000117718>.

CURZON, A. Y. *et al.* A duplication of the Anti-Müllerian hormone gene is associated with genetic sex determination of different *Oreochromis niloticus* strains. **Heredity**, [S.L.], v. 125, n. 5, p. 317-327, 9 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41437-020-0340-x>.

EL-GREISY, Z.A.; EL-GAMAL, A.e.. Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17 α -methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment. **Egyptian Journal Of Aquatic Research**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 59-66, 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejar.2012.08.005>.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de Inteligência e Mercado em Aquacultura (CIAqui): Produção da aquacultura e piscicultura brasileira por espécie. 2023. Available at: <https://www.embrapa.br/en/cim-centro-de->

inteligencia-e-mercado-em-aquacultura/producao-brasileira/categorias. Accessed: 03 mar. 2024.

ESHEL, O. *et al.* Fine-mapping of a locus on linkage group 23 for sex determination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Genetics*, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 222-224, 27 out. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02128.x>.

ESHEL, O *et al.* Linkage and Physical Mapping of Sex Region on LG23 of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **G3 Genes|Genomes|Genetics**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 35-42, 1 jan. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1534/g3.111.001545>.

ESHEL, Orly *et al.* Identification of male-specific amh duplication, sexually differentially expressed genes and microRNAs at early embryonic development of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-17, 9 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-774>.

FAO, Food And Agriculture Organization. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024: blue transformation in action. FAO, [S.L.], p. 1-219, 7 jun. 2024. FAO. <http://dx.doi.org/10.4060/cd0683en>

HU, Yuan. Regulatory Concern of Polymerase Chain Reaction (PCR) Carryover Contamination. **Polymerase Chain Reaction For Biomedical Applications**, [S.L.], p. 58-68, 14 dez. 2016. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/66294>.

JIANG, Dong-Neng *et al.* Polymorphism in a sex-linked DNA marker located on LG23 in Hainan strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal Of The World Aquaculture Society*, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 205-223, 3 jun. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jwas.12815>.

KANG, Hyun Min *et al.* Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. **Nature Genetics**, [S.L.], v. 42, n. 4, p. 348-354, 7 mar. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.548>.

KAZYAK, David C. *et al.* Rapid Visual Assessment to Determine Sex in Brook Trout. **North American Journal Of Fisheries Management**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 665-668, 29 maio 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1080/02755947.2013.785998>.

KOBAYASHI, Y. *et al.* Diversity and Plasticity of Sex Determination and Differentiation in Fishes. *Sexual Development*, [S.L.], v. 7, n. 1-3, p. 115-125, 31 ago. 2013. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000342009>.

LEE, B.-Y. *et al.* Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis. *Animal Genetics*, [S.L.], v. 34, n. 5, p. 379-383, 18 set. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2052.2003.01035.x>.

LI, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009. 25:2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.

LI, Minghui *et al.* A Tandem Duplicate of Anti-Müllerian Hormone with a Missense SNP on the Y Chromosome Is Essential for Male Sex Determination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Plos Genetics*, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 1005678, 20 nov. 2015. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1005678>.

LI, Minghui; WANG, Deshou. Gene editing nuclease and its application in tilapia. *Science Bulletin*, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 165-173, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scib.2017.01.003>.

LIU, Han-Ming *et al.* Recessive/dominant model: alternative choice in case-control-based genome-wide association studies. *Plos One*, [S.L.], v. 16, n. 7, p. 0254947, 21 jul. 2021. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0254947>.

LONGENECKER, Ken *et al.* Errors in estimating reproductive parameters with macroscopic methods: a case study on the protogynous blacktip grouper *Epinephelus fasciatus* (forsskal 1775). *Journal Of Fish Biology*, [S.L.], v. 105, n. 4, p. 1256-1267, 31 jul. 2024. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jfb.15893>.

LUPCHINSKI JÚNIOR, Enio *et al.* Avaliação da variabilidade das gerações G0 e F1 da linhagem GIFT de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por RAPD. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 233-240, 7 ago. 2008. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v30i2.4708>.

MARTÍNEZ, Paulino *et al.* Identification of the Major Sex-Determining Region of Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genetics*, [S.L.], v. 183, n. 4, p. 1443-1452, 1 dez. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.109.107979>.

MORINAGA, Chikako *et al.* The hotel mutation of medaka in the anti-Müllerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 104, n. 23, p. 9691-9696, 5 jun. 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0611379104>.

MOTAHARI, Abolfazl S. *et al.* Information Theory of DNA Shotgun Sequencing. **Ieee Transactions On Information Theory**, [S.L.], v. 59, n. 10, p. 6273-6289, out. 2013. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE). <http://dx.doi.org/10.1109/tit.2013.2270273>.

NARABALLOBH, Watcharapong *et al.* Association of genetic markers with sex determination in Thai red tilapia. **Veterinary Integrative Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 73-83, 6 set. 2021. Chiang Mai University. <http://dx.doi.org/10.12982/vis.2022.007>.

PADHI, Bhaja K. *et al.* A bioinformatics workflow for the evaluation of RT-qPCR primer specificity: application for the assessment of gene expression data reliability in toxicological studies. *Regulatory Toxicology And Pharmacology*, [S.L.], v. 111, p. 104575, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104575>.

PALAIOKOSTAS, Christos *et al.* Mapping and Validation of the Major Sex-Determining Region in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Using RAD Sequencing. *Plos One*, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 68389, 11 jul. 2013. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068389>.

PALAIOKOSTAS, Christos *et al.* A novel sex-determining QTL in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bmc Genomics*, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-10, 11 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-1383-x>.

POUNDS, Alexandra *et al.* More Than Fish—Framing Aquatic Animals within Sustainable Food Systems. *Foods*, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 1413, 13 maio 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods11101413>.

POURMOHAMMADI, Reza *et al.* PROBABILISTIC MODELING AND ANALYSIS OF DNA FRAGMENTATION. **Journal Of Biological Systems**, [S.L.], v. 27, n. 02, p. 281-307, jun. 2019. World Scientific Pub Co Pte Lt. <http://dx.doi.org/10.1142/s0218339019500128>.

SENIOR, Alistair McNair *et al.* The fitness consequences of environmental sex reversal in fish: a quantitative review. *Biological Reviews*, [S.L.], v. 87, n. 4, p. 900-911, 27 abr. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185x.2012.00230.x>.

SENIOR, Alistair McNair *et al.* Ecological and Evolutionary Applications for Environmental Sex Reversal of Fish. *The Quarterly Review Of Biology*, [S.L.], v. 90, n. 1, p. 23-44, mar. 2015. University of Chicago Press. <http://dx.doi.org/10.1086/679762>.

SHIRAK, Andrey *et al.* Amh and Dmrta2 Genes Map to Tilapia (*Oreochromis* spp.) Linkage Group 23 Within Quantitative Trait Locus Regions for Sex Determination. *Genetics*, [S.L.], v. 174, n. 3, p. 1573-1581, 1 nov. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.106.059030>.

SISSAO, Rokyatou *et al.* Mismatches between the genetic and phenotypic sex in the wild Kou population of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *PeerJ*, [S.L.], v. 7, p. 7709, 18 set. 2019. PeerJ. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.7709>.

SIQUEIRA, T. V. Aquacultura: a nova fronteira para produção de alimentos de forma sustentável. *Revista do BNDES*, Rio de Janeiro, v.25, n.49, p. 119-170, jun. 2018. Available at: <http://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/16085>. Accessed: 06 mar. 2024.

SUN, Yun-Lv *et al.* Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, [S.L.], v. 433, p. 19-27, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.035>.

SYAIFUDIN, Mochamad *et al.* Species-Specific Marker Discovery in Tilapia. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-11, 10 set. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-48339-2>.

TACON, Albert G. J.; METIAN, Marc. Fish Matters: importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. *Reviews In Fisheries Science*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 22-38, jan. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10641262.2012.753405>.

TASLIMA, Khanam. Sex Determination and Genetic Management in Nile Tilapia using Genomic Techniques. 363 p. Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy,

Institute of Aquaculture, Faculty Of Natural Sciences, University Of Stirling, Stirling, UK, 2017.

TASLIMA, Khanam *et al.* Sex determination in the GIFT strain of tilapia is controlled by a locus in linkage group 23. *Bmc Genetics*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 21-49, 29 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12863-020-00853-3>.

TASLIMA, Khanam *et al.* Evidence of two XX/XY sex-determining loci in the Stirling stock of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, [S.L.], v. 532, p. 735995, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735995>.

TASLIMA, Khanam *et al.* Genomic architecture and sex chromosome systems of commercially important fish species in Asia – Current status, knowledge gaps and future prospects. *Reviews In Aquaculture*, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 1918-1946, 8 jun. 2024. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12939>.

TREWAVAS, Ethelwynn. Tilapiine Fishes of the Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis*, and *Danakilia*. Londres: British Museum Of Natural History, 1983. Available at: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/215113#page/1/mode/1up>. Accessed: 16 jul. 2024.

TRIAY, Cécile *et al.* Structure and Sequence of the Sex Determining Locus in Two Wild Populations of Nile Tilapia. *Genes*, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 1017, 29 aug. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes11091017>.

WANG, Deshou *et al.* **Y-chromosome specific molecular marker of Nile tilapia, and genetic sex determination method and supermale producing method both based on molecular marker.** Assignee: Southwest University. CN103409420B. Filing date: 31 aug. 2013. Patent grant: 15 apr. 2015. Available at: <https://patents.google.com/patent/CN103409420B/en>. Accessed: 29 jan. 2025.

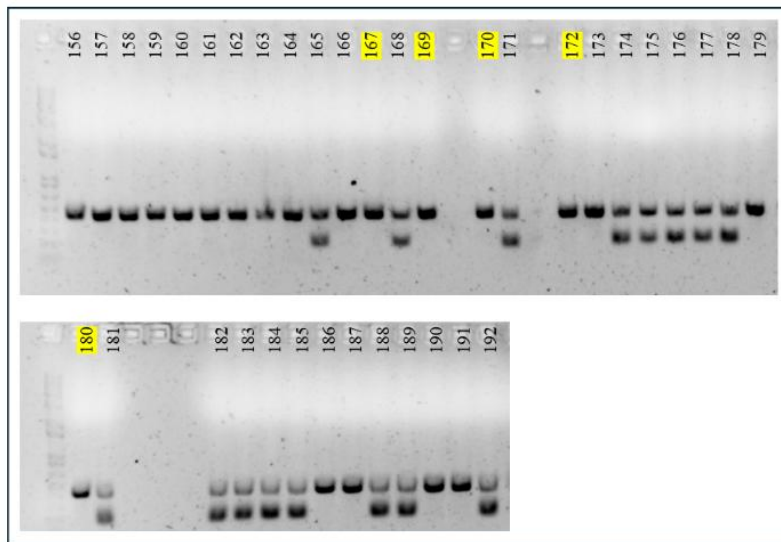
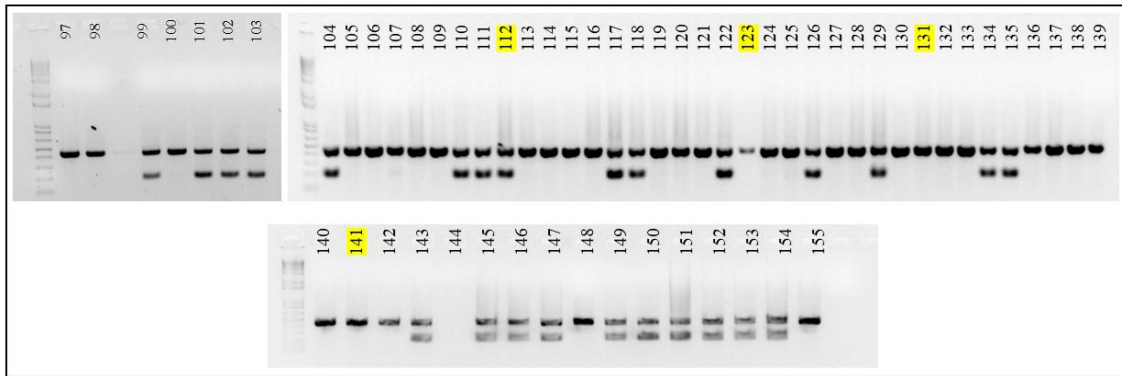
WESSELS, Stephan *et al.* DdRADseq reveals determinants for temperature-dependent sex reversal in Nile tilapia on LG23. *Bmc Genomics*, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-13, 14 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-017-3930-0>.

WU, Xin *et al.* Screening and characterization of sex-linked DNA markers and marker-assisted selection in blue tilapia (*Oreochromis aureus*). *Aquaculture*, [S.L.], v. 530, p. 735934, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735934>.

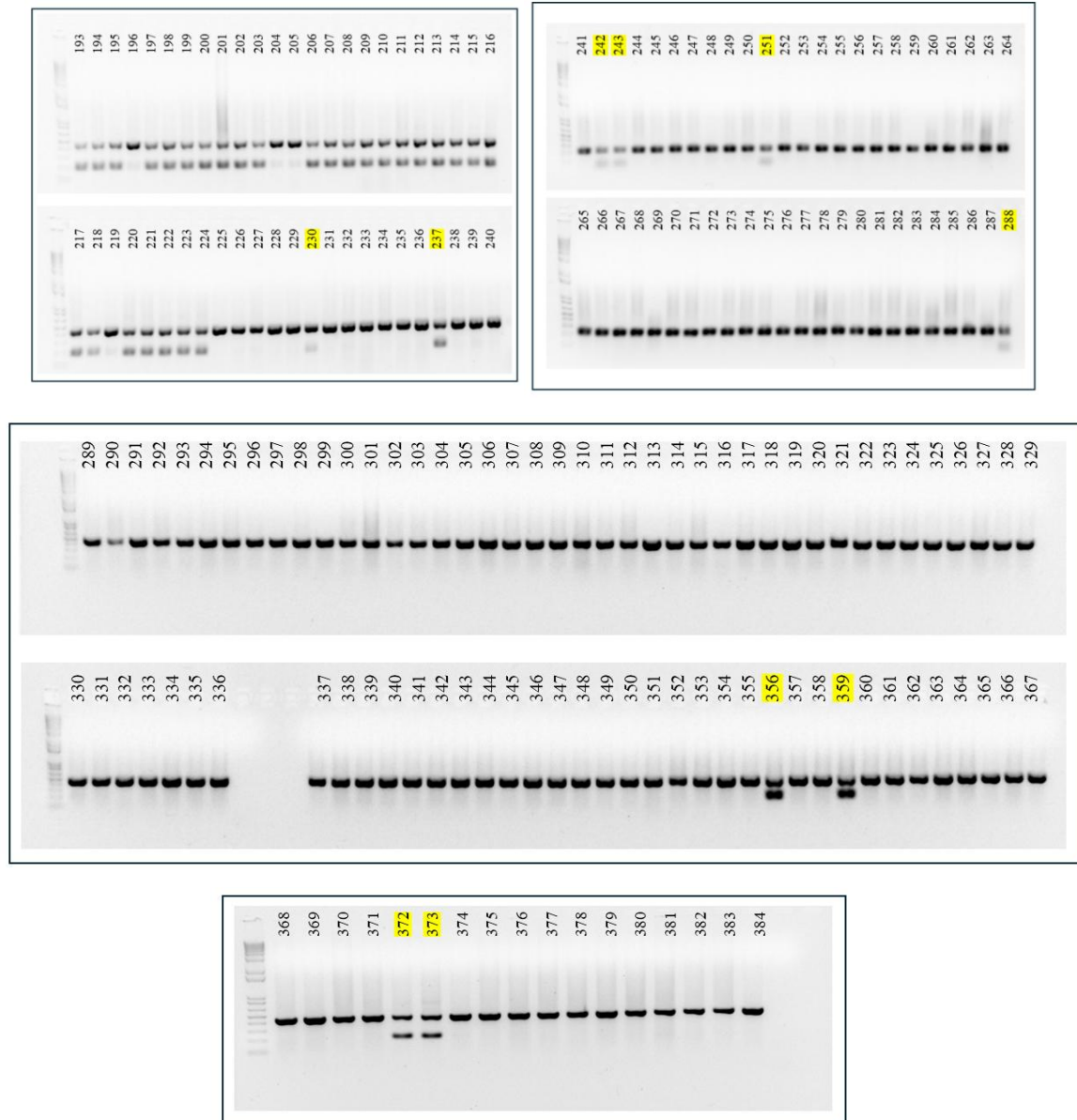
YAN, Yi-Lin *et al.* A Hormone That Lost Its Receptor: anti-müllerian hormone (amh) in zebrafish gonad development and sex determination. **Genetics**, [S.L.], v. 213, n. 2, p. 529-553, 1 out. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.119.302365>.

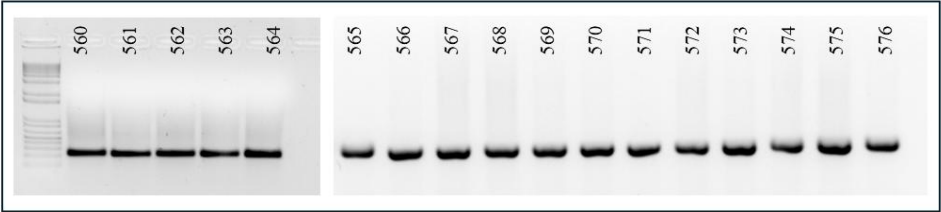
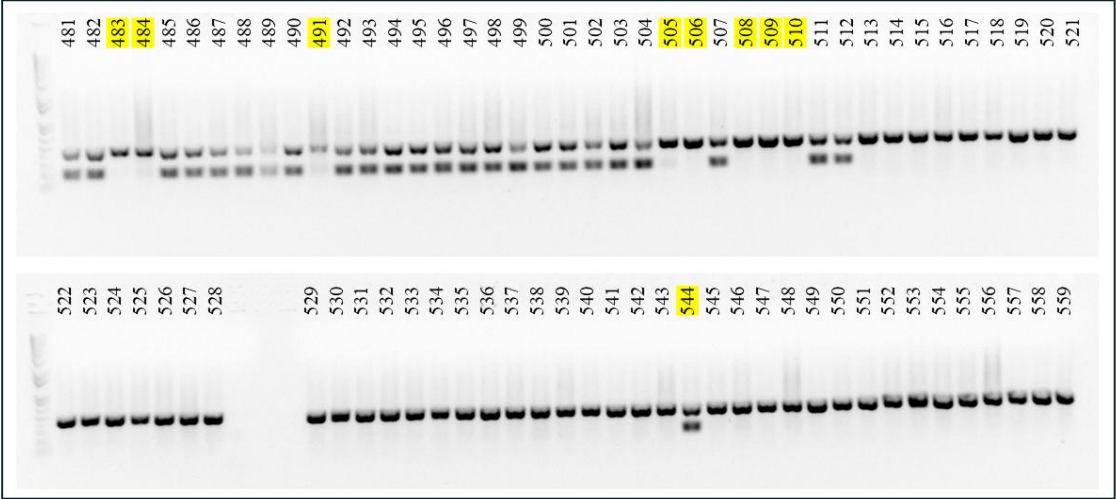
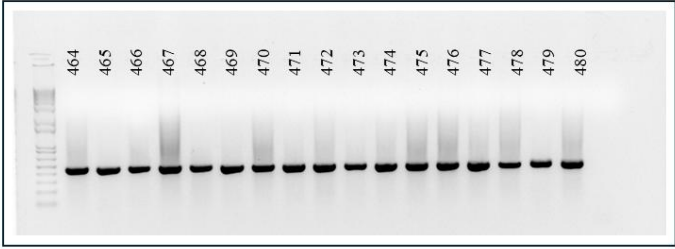
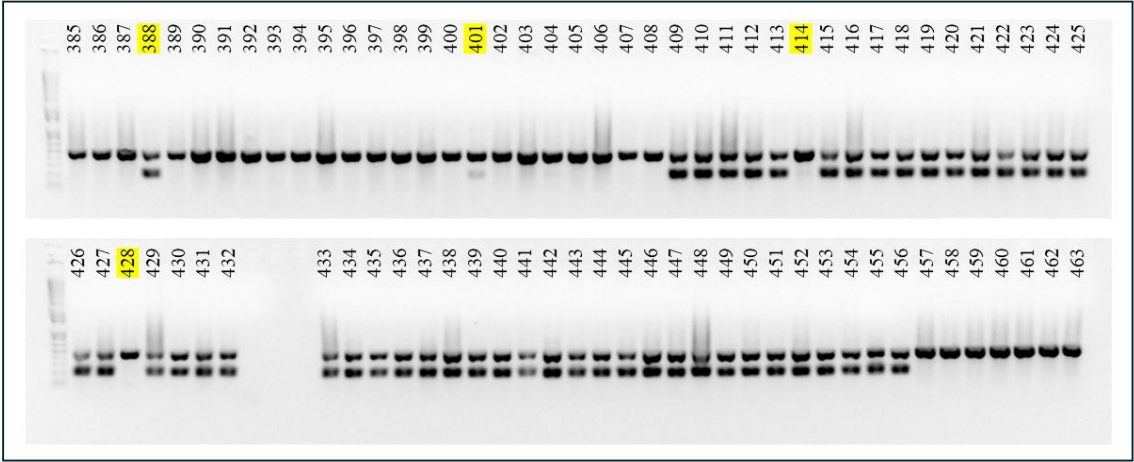
SUPPLEMENTARY MATERIAL

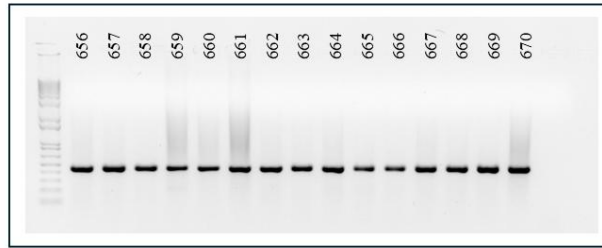
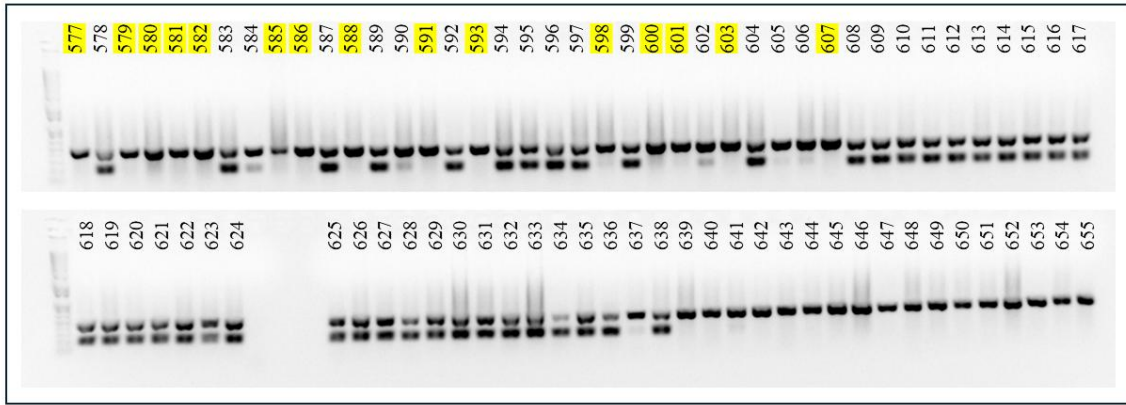
Supplementary material S1. Results of agarose gel electrophoresis of PCR products, performed with the Amh_EVII marker. All samples were from hatchery P2, and those highlighted in yellow indicate discrepant results.



Supplementary material S2. Results of agarose gel electrophoresis of PCR products, performed with the Amh_EVII marker. All samples were from hatchery P3, and those highlighted in yellow indicate discrepant results.







CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

3.1. Considerações Finais

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) destaca-se como uma das principais espécies para a aquacultura mundial, com o Brasil ocupando a quarta posição no ranking global de produção. Em 2022, essa espécie representou 66,15% da piscicultura brasileira, resultado impulsionado pelo uso de linhagens geneticamente aprimoradas, como a GIFT, reconhecida por sua elevada taxa de sobrevivência e rápido crescimento. Para aumentar a eficiência produtiva, práticas como a criação de populações monosexo predominantemente masculinas são amplamente adotadas. Embora o método tradicional de reversão sexual por meio de hormônios continue em uso, alternativas baseadas em cruzamentos genéticos vêm sendo exploradas para mitigar os impactos ambientais e aprimorar a precisão na identificação molecular do sexo. Esse avanço é crucial para garantir sustentabilidade e eficiência nos sistemas de produção, além de viabilizar o manejo genético necessário para a criação de supermachos.

Neste contexto, este estudo concentrou-se na identificação de marcadores moleculares fortemente associados à determinação sexual em *O. niloticus*, com base no germoplasma disponível no Brasil e utilizando um estudo de associação genômica ampla (GWAS). Entre os marcadores testados, o Amh_EVII destacou-se pela sua maior acurácia e qualidade. Adicionalmente, os resultados do GWAS permitiram descartar hipóteses que podem explicar as discrepâncias observadas entre o sexo genotípico e fenotípico, como contaminação de amostras e erros de genotipagem decorrentes de anelamento inadequado de primers. No entanto, não se pôde excluir fatores como erros de fenotipagem, reversão sexual, a atuação de loci alternativos na determinação sexual ou a presença de alelos nulos no cromossomo Y como possíveis fontes de discrepâncias entre genótipo e fenótipo.

O estudo identificou dezessete SNPs altamente associados à determinação sexual no LG23, corroborando a relação estreita dessa região com a determinação do sexo da linhagem GIFT. Apesar disso, fatores genéticos e ambientais adicionais podem explicar a baixa frequência de indivíduos com discrepâncias entre sexo fenotípico e molecular. Além disso, foi detectada uma associação no LG5, cuja relevância na determinação sexual ainda precisa ser investigada, especialmente com dados de famílias segregantes maiores.

Análises complementares, incluindo a anotação funcional das variantes associadas, serão fundamentais para elucidar as causas das discrepâncias observadas. A identificação de marcadores moleculares mais precisos permanece essencial, não apenas

para promover maior sustentabilidade nos sistemas de produção, mas também para aprimorar os programas de melhoramento genético. Esses avanços podem auxiliar na implementação de protocolos para a produção de populações monosexo de machos, reduzindo a dependência de tratamentos hormonais e contribuindo para a eficiência econômica e ambiental da aquacultura de tilápia no Brasil.